

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**



**TESIS DOCTORAL**

**Modelos animales para el estudio de la ecología de la  
resistencia a antibióticos: *Klebsiella pneumoniae* resistente a  
carbapenemas en ambientes nosocomiales**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Gabriel Moyano Ortega**

**Director**

**Bruno González Zorn**

**Madrid**

**© Gabriel Moyano Ortega, 2019**



UNIVERSIDAD  
**COMPLUTENSE**  
MADRID

**DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD DE LA TESIS  
PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE DOCTOR**

D./Dña. Gabriel Moyano Ortega,  
estudiante en el Programa de Doctorado en Veterinaria,  
de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de  
Madrid, como autor/a de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor y  
titulada:

MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS:  
KLEBSIELLA PNEUMONIAE RESISTENTE A CARBAPENEMAS EN AMBIENTES NOSOCOMIALES

y dirigida por: Bruno González Zorn

**DECLARO QUE:**

La tesis es una obra original que no infringe los derechos de propiedad intelectual ni los derechos de propiedad industrial u otros, de acuerdo con el ordenamiento jurídico vigente, en particular, la Ley de Propiedad Intelectual (R.D. legislativo 1/1996, de 12 de abril, por el que se aprueba el texto refundido de la Ley de Propiedad Intelectual, modificado por la Ley 2/2019, de 1 de marzo, regularizando, aclarando y armonizando las disposiciones legales vigentes sobre la materia), en particular, las disposiciones referidas al derecho de cita.

Del mismo modo, asumo frente a la Universidad cualquier responsabilidad que pudiera derivarse de la autoría o falta de originalidad del contenido de la tesis presentada de conformidad con el ordenamiento jurídico vigente.

En Madrid, a 2 de septiembre de 2019

Fdo.: 

Esta DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y ORIGINALIDAD debe ser insertada en  
la primera página de la tesis presentada para la obtención del título de Doctor.



# Agradecimientos

**A mi familia...**



Quiero agradecer a mis padres su amor, esfuerzo, sacrificio, paciencia y comprensión. Gracias por ayudarme incondicionalmente durante toda mi vida y en especial durante el desarrollo de esta tesis.

Gracias a Rocío que empezó siendo novia y acaba esta tesis siendo mi mujer y la futura madre de nuestro hijo (o hija). Gracias por las noches que me has acompañado en el laboratorio cuando solo me quedaban “algunas placas”. Gracias por ser el complemento perfecto a mi desorden. Gracias por tu fe, tu cariño y tus ánimos incondicionales.

Gracias a mis abuelos por enseñarme de dónde vengo y ser un ejemplo. Joaquín, Teresa, Elvira seguro que desde el cielo habéis estado todo este tiempo junto a mí. Gracias Fernando por tus ganas de vivir que siempre han inspirado a tu nieto “el veterinario de ratones”.

Gracias a mis padrinos por abrirme su casa todas las veces que lo he necesitado, por cuidarme y preocuparse por mí. Por pelear conmigo y ayudarme a ser quien yo quería. A Elvira, Luis y los niños por vuestra alegría y cariño.

Gracias a mis tíos, Cesar y Marina, por sus cenas, raquetas, vino y velas. Espero un buen artículo del cajón de sastre. A Joaquín y a Toyi por distraer a mis padres los veranos que me quedaba en el laboratorio. A Cesar, Brenda, David, Alfonso, Joaquín gracias por la paciencia cuando cancelaba planes por falta de tiempo.

Gracias a Bea por marcar el camino y ser una referente. Eres la prueba de que con trabajo y lucha todo se consigue. Gracias por tu generosidad sin límites y por tu amistad. Espero que tu exilio te reporte muchos éxitos y que los sigas compartiendo con todos.

Gracias a la familia Pardo-Pizarro, por tener siempre un plato para mí en vuestra mesa y sofá donde ver al Real Madrid ganar la Champions. A Guillermo y a Gonzalo por su amistad y sus buenos consejos.

Gracias a Bruno por enseñarme que con paz y amor se consigue todo. Gracias por querer siempre sacar un poco más de mí e ir un siempre un poco más lejos. Gracias por ser el “padre” de tesis.

Gracias a Natalia por su ayuda incansable. Gracias por cuidar y preocuparte de todos nosotros, sin ti ninguno habríamos podido terminar nuestras tesis. Gracias por ser la “madre” de tesis.

Gracias a mis compañeros y amigos por hacer el laboratorio menos laboratorio. Gracias Andreas por dejarme estropear el inglés, por la ingeniería de ingeniería de hielo seco y demás las aventuras. Gracias Alfonso por las películas, las fiestas de disfraces y las discusiones de “ciencia”. Gracias a Carri por su humor y su inteligencia, a Belén por su humanidad, a Dani por su integridad (y por dejarme mirar su pantalla), a Cris por su entusiasmo y humor (y por ser mi maestra una semana..), a Cristina por su ayuda y su meticulosidad (los dobles espacios), a los Jose-Manu por aguantarme en los momentos de papa furioso, a Bosco por felicidad constante.....y a todos los nuevos ARU!! Mucha suerte en especial a Irene!

Gracias a mis amigos de Ávila por seguir contando conmigo siempre a pesar del poco tiempo que os he podido dedicar. Gracias Iván por tus llamadas de ánimo y mucha suerte con la tesis que empiezas.



**TESIS DOCTORAL**

**Modelos animales para el estudio de la ecología de  
la resistencia a antibióticos:**

*Klebsiella pneumoniae* resistente a carbapenemas en ambientes  
nosocomiales

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR POR

**Gabriel Moyano Ortega**

Bajo la dirección del Profesor

**Bruno González Zorn**

Madrid, septiembre de 2019



Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Sanidad Animal





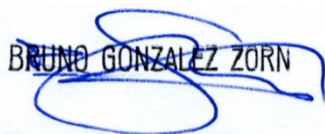


**Bruno González Zorn, Catedrático del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM),**

**CERTIFICO:**

Que la tesis doctoral titulada “MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DE LA ECOLOGÍA DE LA RESISTENCIA A ANTIBIÓTICOS: *KLEBSIELLA PNEUMONIAE* RESISTENTE A CARBAPENEMAS EN AMBIENTES NOSOCOMIALES” que presenta Don Gabriel Moyano Ortega, Licenciado en Veterinaria por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizada en las dependencias del Departamento de Sanidad Animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo mi dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de Doctor.

Por ello, cumpliendo la normativa vigente, informo favorablemente para que proceda a su defensa, en Madrid a 02 de septiembre de 2019.

  
Bruno González Zorn

Fdo. Bruno González Zorn



# Índice

“El amor es una parte del orden. El orden precede al amor, y el amor únicamente puede desarrollarse en el marco del orden.”

BERT HELLINGER



## Tabla de contenido

<b>Índice.....</b>	<b>11</b>
Índice de tablas.....	15
Índice de imágenes.....	15
Índice de figuras.....	15
Índice de bocetos .....	16
<b>Abreviaturas.....</b>	<b>17</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>19</b>
Introducción .....	21
Materiales y métodos.....	22
Resultados y discusión.....	24
Conclusiones .....	25
<b>SUMMARY.....</b>	<b>27</b>
Introduction.....	29
Materials and Methods .....	30
Results and Discussion .....	32
Conclusions.....	33
<b>Introducción.....</b>	<b>35</b>
<b>Historia de los modelos animales.....</b>	<b>37</b>
De los filósofos griegos al Maquinismo de Descartes .....	37
El s. XVIII: El comienzo de las consideraciones éticas por el uso de animales .....	40
El s.XIX: El fin de la vivisección y el alza de la medicina moderna.....	40
Modelos animales en el estudio de la microbiología.....	43
Modelos animales para el estudio de la transmisión de microorganismos.....	45
El desafío del estudio de la resistencia antibióticos en modelos animales.....	47
El impacto en la sociedad de los modelos animales para el estudio de enfermedades infecciosas.....	57
El siglo XX y las “3R” .....	59
<b>La resistencia a antibióticos: El reto de la medicina del siglo XXI .....</b>	<b>61</b>
<i>Klebsiella pneumoniae</i> y la resistencia a antibióticos .....	63
El papel de los antibióticos en la diseminación de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	65
<b>Introducción a los modelos animales desarrollados en este trabajo.....</b>	<b>67</b>
Modelo animal para el estudio de la colonización por <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de carbapenemasas .....	67
Modelo animal para el estudio de la transmisión de bacterias resistentes a antibióticos por contacto directo.....	69
Modelos animales para el estudio de compuestos inhibidores de la conjugación.....	70
<b>Justificación y Objetivos .....</b>	<b>75</b>
<b>Materiales y métodos .....</b>	<b>79</b>
Procedimientos con animales .....	81

<b>Modelo animal para el estudio de la colonización por <i>Klebsiella pneumoniae</i> productoras de carbapenemasas.....</b>	<b>82</b>
Revisión bibliográfica y análisis de la base de datos disponible en el HULP .....	82
<b>Preparación de los inóculos de <i>Klebsiella pneumoniae</i> productora de <i>bla</i><sub>OXA48</sub> .....</b>	<b>82</b>
<b>Métodos de detección.....</b>	<b>83</b>
<b>Análisis del potencial colonizador y los patrones de excreción en heces de las cepas en estudio en el modelo de O48PKp .....</b>	<b>84</b>
<b>Análisis del efecto de los antibióticos sobre el potencial de colonización de O48PKp ST11 y la transmisión horizontal pOXA48.....</b>	<b>84</b>
<b>Transmisión directa boca a boca de <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....</b>	<b>85</b>
<b>Preparación de los inóculos de KPCPKp.....</b>	<b>85</b>
<b>Métodos de detección.....</b>	<b>85</b>
Estructura poblacional .....	86
Ensayos de transmisión.....	87
<b>Ensayo de conjugación <i>in vivo</i> .....</b>	<b>88</b>
<b>Preparación de los inóculos de <i>E. coli</i>.....</b>	<b>88</b>
<b>Métodos de detección.....</b>	<b>88</b>
<b>Análisis de datos .....</b>	<b>89</b>
<b>Resultados .....</b>	<b>91</b>
Descripción del brote epidémico de CP-Kp portadoras de <i>bla</i> <sub>OXA48</sub> .....	93
Potencial de colonización y patrón de excreción de los dos clones de O48PKp (ST11 y ST405) .....	94
Dinámica de colonización de O48PKp en un modelo animal: Efecto de la amoxicilina sobre la persistencia de pOXA48 en la microbiota intestinal .....	97
Diseminación de <i>bla</i> <sub>OXA48</sub> a la microbiota intestinal del ratón.....	98
<b>Sistema de alojamiento de animales de laboratorio para el estudio de la transmisión de infecciones por interacciones “boca a boca”.....</b>	<b>100</b>
Diseño y construcción del sistema de alojamiento.....	100
Definición del modelo experimental y los grupos de contacto.....	104
Transmisión por contacto directo boca a boca de <i>Klebsiella pneumoniae</i> portadora de <i>bla</i> <sub>KPC</sub> ....	106
Modelo <i>in vivo</i> para el desarrollo de moléculas inhibitoras de la conjugación .....	110
<b>Discusión .....</b>	<b>113</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>135</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>139</b>

## Índice de tablas

- Tabla 1. Medios selectivos y antibióticos empleados en cada modelo experimental.....**79**
- Tabla 2. Protocolo de PCR y primers empleados para la detección de la cepa de *Klebsiella pneumoniae* ST258 resistente a Colistina empleados en este trabajo.....**83**
- Tabla 3. Esquema de los tratamientos antibióticos administrados cada día a los animales alojados en el sistema de transmisión.....**84**
- Tabla 4. Perfil de resistencia de la cepa inoculada y los transconjugantes aislados.....**95**
- Tabla 5. Medias y Desviaciones estándar de los tres valores principales registrados.

## Índice de imágenes

- Imagen 1. Portada del libro “*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*” de William Harvey. Fuente: Wikimedia commons.....**37**
- Imagen 2. Diferencias anatómicas entre el intestino del ratón y el humano. Adaptado de (Nguyen, Vieira-Silva, Liston, & Raes, 2015).....**51**
- Imagen 3. Imágenes del sistema de alojamiento y el contacto de dos ratones.**102**
- Imagen 4. Fotograma extraído del vídeo de una de las réplicas en la que se muestra un contacto.....**103**

## Índice de figuras

- Figura 1. Meta-análisis de los datos publicados de secuenciación del 16S ADNr de ratones y humanos realizada por Nguyen y colaboradores.....**53**
- Figura 2. Número de nuevos aislados de enterobacterias productoras de *bla*<sub>OXA48</sub> al año en Hospital Universitario de La Paz.....**90**
- Figura 3. Número de ratones positivos a la cepa inoculada por día y media de UFC/g de heces de estos.....**91**
- Figura 4. Evolución en el tiempo de los niveles de excreción de *Klebsiella pneumoniae* productora de *bla*<sub>OXA48</sub>.....**92**
- Figura 5. Evolución del número de ratones positivos y los niveles de excreción en heces de *Klebsiella pneumoniae* productora de *bla*<sub>OXA48</sub> inoculada por vía oral y el efecto de la administración de amoxicilina sobre esta.....**94**
- Figura 6. Número de contactos por grupo individuo en cada grupo experimental.....**101**
- Figura 7. Representación de los dos factores principales del análisis de componentes principales.....**104**



## Índice de bocetos

- Boceto 1.- Esquema del alojamiento, donde se pueden identificar todas las cubetas y las bandejas laterales.....**97**
- Boceto 2.- Imagen de la base que representa la distribución de las diferentes cubetas.....**98**
- Boceto 3.- Esquema de una pared larga.....**98**
- Boceto 4.- Esquema de una pared lateral corta.....**99**
- Boceto 5.- Esquema de la pared corta que divide la cubeta central de la cubeta adyacente.....**99**
- Boceto 6.- Esquema de la pared larga de las cubetas laterales adyacentes.....**99**
- Boceto 7.- Esquema de las piezas de las bandejas de alimentación y agua.....**100**
- Boceto 8.- Esquema de la vista cenital que representa la tapa de cristal (azul) sobre las cubetas.....**100**

## Abreviaturas

S. Siglo

Kp. *Klebsiella pneumoniae*

ST. Secuenciotipo

STs. Secuenciotipos

CPKp. *Klebsiella pneumoniae* productora de carbapenemasas

KPC. Carbapenemasa de *Klebsiella pneumoniae*

OXA48. Oxacilina tipo 48

O48PKp. *Klebsiella pneumoniae* productora de OXA48

KPCPKP. *Klebsiella pneumoniae* productora de KPC

COIN. Inhibidor de la conjugación

2HDA. Ácido 2-hexadecinoico

HULP. Hospital Universitario de la Paz

EntBac. Enterobacterias

CPEntBac. Enterobacterias productoras de carbapenemasas

O48EntBac. Enterobacterias productoras de OXA48

ESKAPE. Bajo esta nomenclatura se agrupan las bacterias de las siguientes especies con perfiles específicos de resistencia; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.

ADN. Ácido desoxirribonucleico.

PBS. Buffer Fosfato Salino



# Resumen

Todo cabe en lo breve. Pequeño es el niño y encierra al hombre; estrecho es el cerebro y cobija el pensamiento; no es el ojo más que un punto y abarca leguas.

ALEJANDRO DUMAS



## Introducción

Los modelos animales han sido fundamentales a lo largo de la historia para el avance de la ciencia. La consideración de los animales, que pasaron de ser meras máquinas a seres con sensibilidad cuyo uso debe estar racionalizado y controlado, fue un proceso complejo que implicó a filósofos, médicos, investigadores y a la sociedad civil. La falta de repercusión en la sociedad de los avances obtenidos fue una de las principales razones que dificultó la aceptación del uso de animales en investigación.

A diferencia de otras ciencias, los avances obtenidos en el campo de las enfermedades infecciosas, como las vacunas y los sueros, impactaron sustancialmente la vida civil de la época. Además, los modelos animales fueron claves en la aceptación de la teoría de los gérmenes. Dentro de este campo, la transmisión de bacterias ha sido ampliamente estudiada mediante diferentes modelos animales, pero estos no se han llegado a generalizar y han sido sustituido por modelos matemáticos.

Debido al incremento de los niveles de resistencia a los antibióticos y la amenaza para la *Salud Única* que esto supone, el desarrollo de modelos animales para el estudio de este fenómeno se ha incrementado durante los últimos años. Cabe destacar, que los modelos animales para el estudio de la microbiota han aportado relevantes descubrimientos en la lucha contra la diabetes, el cáncer o el autismo.

A pesar de las diferencias entre humanos y ratones, estos se han convertido en el modelo más utilizado, especialmente para el estudio del microbioma, el desarrollo de nuevos compuestos antibióticos o nuevas vacunas. Con el auge de la resistencia a antibióticos, los modelos animales han ganado importancia en el estudio de las zoonosis, las terapias de descolonización y la optimización de las terapias antibióticas.

Una de las bacterias más relevantes en relación a la diseminación de determinantes de resistencia a antibióticos es *Klebsiella pneumoniae* (Kp), pues en esta bacteria se han descrito por primera vez multitud de genes de resistencia de importancia clave en esta década como *OXA48*, *KPC*, *TEM* y *qnrA* y *qnrB*. En concreto las cepas de esta bacteria resistentes a Carbapenemas han sido clasificadas dentro del grupo de bacterias de alta importancia clínica para la salud humana definido por las siglas ESKAPE (bajo esta nomenclatura se agrupan las bacterias de las siguientes especies con perfiles específicos de resistencia; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp.). Estas bacterias se encuentran extendidas por todo el mundo y cobran gran relevancia en los países mediterráneos donde causan importantes brotes nosocomiales.

Para incrementar el número de herramientas disponibles que permitan atajar estos problemas, en este trabajo se han desarrollado 3 modelos animales que exploran aspectos fundamentales en la ecología de la resistencia a antibióticos como son la colonización, la transmisión y la diseminación de bacterias resistentes.

## Materiales y métodos

Todos los procedimientos con animales realizados en este trabajo fueron autorizados por el Comité Ético de la Facultad de Veterinaria de Madrid, El Órgano Habilitado de la Universidad Complutense y la Comunidad de Madrid (entidades competentes en la materia). En total 179 ratones C57BL6 de ambos sexos fueron empleados en el desarrollo de los modelos de colonización, transmisión e inhibición de la conjugación *in vivo*. Todos los animales provenían de un mismo origen y fueron analizados para detectar posibles interacciones de su microbiota intestinal con los procedimientos.

En todos los experimentos se empleó la administración por vía oral mediante sondaje gástrico de un inóculo bacteriano. Para ello se preparan de la misma manera 5 inóculos, uno por cada cepa bacteriana empleada, partiendo de una sola colonia e incubando en medio líquido hasta alcanzar la concentración deseada. La detección de las cepas en heces se realizó mediante placas con medios selectivos suplementadas con antibiótico.

Las cepas empleadas fueron: dos clones de Kp productora de *bla*<sub>OXA48</sub> (O48PKp) pertenecientes a los secuenciotipos (ST) 11 y 405 provenientes del Hospital Universitario de la Paz (HULP), una cepa de Kp productora de *bla*<sub>KPC3</sub> (KPCPKp) perteneciente al ST258 proveniente del Hospital Universitario St. Orsola y dos cepas de *Escherichia coli* MDS52 provenientes de un modelo de conjugación *in vitro*, con perfiles específicos de resistencia siendo la donadora portadora del plásmido pOXA38.

Para los ensayos de colonización se procedió a la inoculación por vía oral a cada grupo de la cepa correspondiente de O48PKp pertenecientes al ST11 y ST405, realizándose el seguimiento de los niveles de excreción en heces durante un periodo de 14 o 28 días. De esta manera, en concreto, se analizó la capacidad de persistir en el ratón, los patrones de excreción, la diseminación del plásmido y el efecto de la Amoxicilina.

Los ensayos de transmisión se realizaron en un sistema de alojamiento específicamente diseñado para permitir el contacto directo entre ratones exclusivamente boca a boca. Este sistema consta de una cubeta central y 5 adyacentes, permitiendo la administración de agua y bebida de manera independiente. En este alojamiento se determinó la estructura poblacional de contacto más efectiva y se procedió a la inoculación de KPCPKp al ratón alojado en la cubeta central, estudiándose si existía transmisión directa entre este y los alojados en las cubetas adyacentes.



Por último, los ensayos de inhibición de la conjugación se llevaron a cabo mediante la administración por vía oral de la cepa de *E. coli* donadora de pOXA38 y la receptora estudiándose la frecuencia de conjugación *in vivo*. Al inóculo, en cada grupo experimental, se le suplemento con buffer fosfato salino (PBS), ácido linoleico y 2HDA, comparándose las diferencias entre los tres grupos experimentales.

## Resultados y discusión

En el modelo de colonización, las cepas de O48PKp pertenecientes al ST11 y ST405 presentaron diferentes tendencias en los patrones de excreción. El ST405 se excretó en un mayor número de animales y en una mayor concentración comparado con ST11. Esta puede ser una de las razones por las que este ST ha disminuido su presencia en el hospital. Sin embargo, el ST11 permaneció un mayor número de días en el hospedador y se detectó en un menor número de animales. La administración de un tratamiento de Amoxicilina incrementó los niveles de O48PKp ST11 en heces permitiendo detectar animales positivos que fueron considerados negativos en días anteriores. Además, permitió la detección de *E. coli* transconjugantes de la microbiota intestinal del ratón. Este modelo, en el futuro, podrá ser empleado para el estudio de nuevos métodos de detección de portadores, protocolos de terapia antibiótica y otras alternativas terapéuticas.

En el modelo de contacto boca a boca, se comprobó la transmisión por contacto directo de KPCPKp demostrándose la eficacia del sistema de alojamiento diseñado y la estructura poblacional elegida. Nuevos estudios deben ser realizados para definir las variables que más afectan a la transmisión, siendo la duración de los contactos y el

tratamiento antibiótico los principales factores potencialmente relacionados con la transmisión en este estudio.

Los ensayos de conjugación *in vivo* permitieron detectar la eficacia del ácido 2HDA como inhibidor de la conjugación, reduciendo la frecuencia de conjugación de manera significativa. Esta alternativa podrá ser empleada en el futuro para controlar la diseminación de plásmidos epidémicos, pudiéndose emplear este modelo murino para testar su eficacia.

## Conclusiones

Los modelos animales han tenido un papel muy relevante en la investigación en el campo de las enfermedades infecciosas. En esta tesis mediante tres modelos murinos se ha comprobado como su papel sigue siendo clave en la lucha contra la resistencia a antibióticos. El primer modelo murino ha permitido demostrar las diferencias la capacidad de colonización y el patrón de excreción de dos ST de 048PKp. Siendo estas imposibles de valorar en el hospital, este modelo ha podido ayudar a explicar el éxito de ST11 sobre ST405. Por otro lado, en el modelo de transmisión, se ha observado como la transmisión de esta bacteria ocurre de manera natural por contacto directo y como los antibióticos aceleran este proceso. Por último, en el modelo de conjugación *in vivo* se ha podido profundizar en el papel de los plásmidos en la diseminación de genes de resistencia y en el desarrollo de una alternativa para controlar este fenómeno como son los inhibidores de la conjugación.



# SUMMARY

A simple summary of my life is that my parents worked very hard so that I could have a great education, and I took that education and worked very hard to get where I am. I would like my kids' lives to be exactly the same

Guy Kawasaki



## Introduction

Animal models have been fundamental throughout history for the advancement of science. The consideration of these, which went from being mere machines to sensible creatures whose use must be rationalized and controlled, was a complex process that involved philosophers, doctors, researchers and the civil society. The lack of impact on the day-to-day life of that time of the progress achieved was one of the main reasons that made animal-based research difficult to be accepted.

Unlike for other sciences, animal models were fundamental in the acceptance of “The Germ Theory”. The progress made in the field of infectious diseases, such as vaccines, impacted the civil life of the time. The transmission of bacteria has been widely studied by different animal models, but these have not been implanted and standardized, therefore they have been replaced by mathematical models.

Due to the increase in the antibiotic resistance levels and the *One-Health* threat that these represent, the development of new animal models for the study of this phenomenon increased in the recent years. It is important to highlight, that, the animal models for the study of the microbiota and its functions have brought relevant discoveries such as its relationship with diabetes, cancer or autism.

Despite the differences between humans and mice, these have become the most used model, especially for the study of the microbiome and the development of new antibiotic compounds or new vaccines. With the rise of antibiotic resistance, animal models have gained importance in the study of zoonoses, decolonization therapies and the optimization of antibiotic therapies.

One of the most relevant bacteria in the field of antimicrobial resistance is Kp, due to its role in the dissemination of antibiotic resistance determinants. Several resistance genes of key importance in this decade have been described for the first time in this pathogen such as *OXA48*, *KPC*, *TEM*, *qnrA* and *qnrB*. It is important to highlight that, the strains of this bacterium, resistant to carbapenems, have been classified within the group of bacteria of high clinical importance for human health defined by the acronym ESKAPE (this abbreviation groups determined bacteria with specific resistance profiles; *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Enterobacter* spp.). These bacteria are worldwide spread and its relevance has increased in the Mediterranean countries where it cause important nosocomial outbreaks.

To increase the number of tools available to address these problems, in this work, three animal models that were developed to explore fundamental aspects in the ecology of antibiotic resistance, such as, colonization transmission and spread of resistant bacteria have been developed.

## Materials and Methods

All the animal procedures performed in this work were authorized by the Community of Madrid. In total, 179 C57BL6 mice, of both sexes, were used in the development of the colonization, transmission and inhibition of conjugation models. All animals came from the same origin and were analysed for possible interactions of their intestinal microbiota with the procedures.

In all experiments, oral administration of a bacterial inoculum by gastric gavage was used. For this, five inoculums were prepared, one for each strain used, starting from a single colony and incubating in liquid medium until it reached the desired concentration. Bacteria in the stools were detected by selective media supplemented with antibiotic plating

The strains used were: two clones of O48PKp belonging to the ST11 and ST405 from the University Hospital of La Paz, a strain of KPCPKp belonging to the ST258 from St. Orsola University Hospital and two strains of *E. coli* MDS52 with specific resistance profiles and the plasmid pOXA38.

For colonization experiments, each group of the corresponding strain belonging to the ST11 and the ST405 was orally inoculated. Serial sampling was carried out during 14 or 28 days. In this model, the ability to persist in the mouse, excretion patterns, dissemination of the plasmid and the effect of amoxicillin were studied.

For the transmission model, a housing system, that allows direct contact between mice exclusively by mouth to mouth, was developed. This system consists of a central cage and five adjacent ones, allowing the administration of water and feed independently. In this experiment, the most effective population-contact structure was determined. The mouse housed in the central cage was inoculated with KPCPKp, studying if there was direct transmission between it and those housed in adjacent cages.

For the conjugation inhibition assays, the donor and recipient strains were orally administered to study the frequency of conjugation in vivo. The inoculum is supplemented with phosphate buffered saline, linoleic acid and 2-hexadecanoic acid, comparing the differences between the three experimental groups.



## Results and Discussion

In the colonization model, the strains of O48PKp belonging to the ST11 and the ST405 showed different trends in the excretion patterns. ST405 was excreted in a greater number of animals and in a higher amount compared to ST11. This may be one of the reasons why this clone has decreased its presence in the studied hospital. Per contrary, ST11 remained a greater number of days in the mouse and it was detected in a smaller number of animals. The administration of an Amoxicillin treatment increased the number of bacteria in faeces allowing the detection of positive animals that were considered negative. In addition, it allowed the detection of *E. coli* transconjugants from the mouse intestinal microbiota. This model, in the future, could be used for the study of new methods of carrier detection, antibiotic therapy protocols and other therapeutic alternatives.

In the mouth-to-mouth contact model, the direct contact transmission of KPCPKp was proved, showing the effectiveness of the designed housing system and the chosen population structure. New studies should be carried out to define the variables that most affect transmission. The duration of the contacts and antibiotic treatment appeared to be the main factors that presented a potential greater relationship with the transmission.

*In vivo* conjugation assays made possible to detect the efficacy of 2HDA as an inhibitor of conjugation by significantly reducing the conjugation frequency. This alternative may be used in the future to control the spread of epidemic plasmids, and this murine model can be used to test its effectiveness.

## Conclusions

Animal models have played a very important role in research in the field of infectious diseases. In this thesis, through three murine models, it has been proven that their role can be useful in the fight against antibiotic resistance. The first murine model has allowed us to demonstrate the differences in the colonization capacity and the excretion pattern of two ST of O48PKp. The results may explain the success of ST11 over ST405 in the hospital. On the other hand, in the second model, we have been able to observe how the transmission of Kp occurs naturally by direct contact and how antibiotics accelerate this process. Finally, in the third model, it has been possible to investigate the role of plasmids in the dissemination of resistance genes in vivo and the development of an alternative to control this phenomenon such as conjugation inhibitors.



# Introducción

“Ought we, for instance (to give an illustration of what I mean), to begin by discussing each separate species-man, lion, ox, and the like-taking each kind in hand independently of the rest, or ought we rather to deal first with the attributes which they have in common in virtue of some common element of their nature, and then proceed from this as a basis for the consideration of them separately?”

- ARISTOTELES - “On the parts of Animals”



## Historia de los modelos animales

### De los filósofos griegos al Maquinismo de Descartes

Casi 1500 años antes de que Antonie van Leeuwenhoek describiera por primera vez las bacterias, los “científicos” griegos comenzaron a emplear modelos animales para estudiar la anatomía y la fisiología humanas [Franco, 2013]. Sin embargo, aunque sus descubrimientos fueron documentados y compartidos a través de las rutas comerciales, no fue hasta el Renacimiento cuando los modelos animales adquirieron un papel fundamental en el avance de la ciencia, principalmente en el campo de la fisiología [O'Malley, 1964].

El anatomista renacentista Vesalius, infringiendo las leyes civiles y el dogma religioso, comenzó a emplear animales y cuerpos humanos para investigar las similitudes y diferencias entre especies. Vesalius fue uno de los primeros médicos que usó animales en sus clases y experimentos. Su libro *“humani corporis fabrica”*<sup>1</sup> es considerado como fundacional dentro de la anatomía moderna [Maehle, 1987].

Durante este periodo, a pesar de los tabús sociales, el pensamiento filosófico de la época apoyó el uso de animales en experimentación [von Staden and Chalcedonius, 1989]. Por ejemplo, la Ética griega no contemplaba ningún dilema moral en el uso de animales con propósitos de investigación. La teoría de la *“scala naturae”*<sup>2</sup>, posicionaba a los animales por debajo de los humanos debido a diferencia de estos con sus deidades

---

<sup>1</sup> “De humani corporis fabrica” (“De la estructura del cuerpo humano”) es una obra de texto e ilustrada sobre anatomía humana escrita por Andrés Vesalio en 1543. Esta obra es el resultado de sus estudios de observación directa y práctica quirúrgica, siendo revolucionario en su época.

<sup>2</sup> “Scala naturae” (“La Cadena del Ser”) es una teoría recurrente a lo largo de la historia de la biología que se remonta a los clásicos griegos, como Platón y Aristóteles. Esta idea plantea una progresión de series orgánicas derivada o resultante en el ser humano.

antropomorfas. Esta moral influyó el pensamiento judeo-cristiano y no fue hasta el siglo XIII cuando el uso de animales comenzó a ser discutido como un acto en contra de la moral. Por ejemplo, para Santo Tomás de Aquino, la crueldad contra los animales precedía a la crueldad contra los hombres [Regan and Singer, 1976].

Posteriormente, en el siglo XVII, René Descartes definió a los animales como máquinas sin sentimiento y esta teoría filosófica fue empleada por varios científicos de la época como justificación para realizar experimentos de una crueldad extrema [Maehle, 1987]. Otros filósofos contemporáneos como Locke o Kant atribuyeron la capacidad de sentir a los animales, pero los consideraron como meros medios para el progreso humano. Con respecto al uso de animales en ciencia, Kant escribió en su teoría “Duties to animals”<sup>3</sup> que los vivisectores, los que usan animales para sus experimentos, actúan siempre con crueldad aunque, si su propósito es loable y pueden justificar este acto, poseen todo el derecho ya que los animales deben ser considerados meros instrumentos [Potter, 2005].

Uno de los médicos más brillantes de la época, William Harvey, fue pionero en el campo de la anatomía comparada y describió por primera vez la circulación de la sangre y la función del corazón en varios taxones como los mamíferos, peces, anfibios, reptiles e insectos [McMullen, 1995]. Su libro “*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*”<sup>4</sup> fue una revolución por su rigurosa metodología en los procedimientos experimentales y sus conclusiones basadas en la experiencia, contrarias a la doctrina de

---

<sup>3</sup> “Duties to animals” (“obligaciones con los animales” por su traducción al español) se incluye en el contexto teórico del filósofo alemán Immanuel Kant sobre la moralidad. En la misma, se reconoce el sufrimiento animal, pero así mismo se justifica el uso de la experimentación en animales y la crueldad animal en aquellos casos en los que el ser humano se vea beneficiado.

<sup>4</sup> “*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*” (latín para “Un ejercicio Anatómico sobre el movimiento del corazón y la sangre en los organismos vivos”) es la obra del médico William Harvey, publicada por primera vez en 1628. Esta obra representa un referente en la historia de la fisiología.

la época (Imagen 1). El avance desde los métodos filosóficos y metafísicos hasta el método empírico basado en la observación sentó las bases de la ciencia moderna [Weil, 1957].

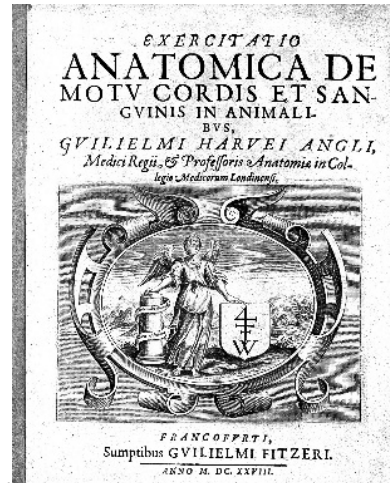


Imagen 1. Portada del libro "*Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*" de William Harvey. Fuente: Wikimedia

Después de su muerte, los colaboradores y seguidores de Harvey continuaron con sus trabajos y teorías científicas, principalmente en anatomía y fisiología, pero también, en química, biología y arquitectura. Por primera vez en la historia, los modelos animales no se limitaron solamente a estudios descriptivos, sino que comenzaron también a ser utilizados para probar directamente nuevas terapias y nuevos fármacos. Por ejemplo, Johann Wepfer empleó animales para investigar la toxicidad de muchos componentes, estos procedimientos sentaron las bases de los ensayos de seguridad actuales para el desarrollo de nuevos compuestos farmacológicos [Maehle, 1987].



## El s. XVIII: El comienzo de las consideraciones éticas por el uso de animales

Incluso a pesar de los avances tecnológicos basados en el uso de animales, algunos tan simples y útiles como los fórceps, los científicos y filósofos de la época comenzaron a cuestionarse a sí mismos y sus prácticas experimentales.

El filósofo Jeremy Bentham afirmó: “La pregunta no es si pueden razonar o si pueden hablar, la pregunta es si pueden sufrir” (en inglés: “The question is not, Can they reason? Nor, Can they talk? But, Can they suffer?”) [*Burns and Hart*, 2015]. Otros filósofos como Rousseau, Voltaire y Schopenhauer también cuestionaron el modelo cartesiano del maquinismo y las consideraciones éticas por el uso de animales se incrementaron. Aunque los intereses humanos fueran todavía razón suficiente, el objetivo, los beneficios y el bienestar animal debían tenerse en cuenta antes del comienzo del experimento. Como Bentham escribió: “Un determinado objetivo, beneficioso para la humanidad y acompañado de un justo planteamiento de realización del mismo (en inglés: “a determinate objective, beneficial to mankind, accompanied with a fair prospect of accomplishment of it”)[*Boralevi*, 1984].

## El s.XIX: El fin de la vivisección y el alza de la medicina moderna

Durante los tres siglos anteriores, la vivisección fue frecuentemente realizada. La disección de animales vivos, incluso en clases magistrales públicas, también fue una práctica común. Uno de los últimos científicos que practicó la vivisección fue François Magendie, fundador del primer laboratorio de fisiología de Francia. Magendie descubrió y probó el efecto de multitud de compuestos como la morfina y los opioides. Irónicamente, él rechazaba el uso de anestésicos o analgésicos en medicina humana o

investigación animal. Por todo esto, su crueldad se hizo famosa en Reino Unido, Alemania y América.

El discípulo de Magendie, Claude Bernard, es considerado el padre de la medicina experimental y fue uno de los pioneros en el uso de la anestesia. Sin embargo, aunque Bernard afirmaba que solamente la realización de experimentos con animales de manera rigurosa y controlada servía para obtener resultados fiables, se oponía al uso de anestesia y analgesia en sus experimentos justificándose en que se desconocía si estas causaban variaciones indeseables en los mismos que pudieran alterar sus resultados.

Durante este siglo, se abrieron los primeros hospitales y comenzó la formación de los primeros estudiantes de medicina. En estos momentos, la medicina ya era considerada una ciencia y comienza el desarrollo de importantes especialidades como la patología, el diagnóstico de enfermedades y la prognosis. Las viejas creencias tradicionales y las terapias infundadas fueron desplazadas por las nuevas terapias de base científica. También los veterinarios fueron integrados en las academias de medicina siendo la primera en hacerlo la Real Academia Francesa de Medicina.

En respuesta a las prácticas de Magendie, la sociedad británica y los políticos reaccionaron contra el abuso animal. La primera ley de protección animal, denominada en inglés “Cruel Treatment of Cattle Act”, fue presentada ante la Sala de los Comunes en 1822. Cincuenta y cuatro años después, en el mismo lugar, la primera ley que regulaba la experimentación animal fue presentada con el nombre en inglés de “Cruelty to Animals Act”. Esta regulación fue impulsada en el Reino Unido por dos razones principales, la primera, desacreditar a los científicos alemanes y franceses que lideraban el conocimiento científico en la época y segundo, por el posicionamiento político de

figuras relevantes de la sociedad británica encabezados por la reina Victoria. La presión y los remordimientos que acosaron a Bernard, le causaron serios problemas psicológicos, que se observan en sus últimas publicaciones que están plagadas de grandes incongruencias.

A pesar de esto, cuando su trabajo y sus libros se extendieron entre la sociedad científica anglosajona, esta le otorgó la Medalla Copley a la relevancia de sus avances científicos obtenidos basados principalmente en la experimentación animal.

Esto también causó un aumento del uso de animales para investigación entre los científicos británicos lo que también incrementó la oposición de la masa social a estos procedimientos. En 1875, la primera sociedad para la abolición de la experimentación animal fue fundada con el nombre de “La sociedad de la calle Victoria para la protección de los animales frente a la vivisección” (en inglés: *“Victoria Street Society for the Protection of Animals Liable to Vivisection”*). Toda esta controversia y presión social se vió reflejada con la introducción de dos nuevas leyes que se incluían y restringían aún más la legislación vigente “Cruelty to Animals Act”. Esta legislación estuvo vigente durante 110 años y fue la única en el mundo durante 50 años. Una de las principales causas del rechazo de opinión pública a la experimentación animal fue el poco impacto social de los avances obtenidos.

Aunque los avances científicos fueron fundamentales para el desarrollo de la ciencia, los beneficios para la salud pública no se vieron reflejados hasta muchos años después. Quizás dentro de los procedimientos experimentales en los que se emplearon animales los relacionados con las enfermedades infecciosas tuvieron un mayor impacto en la

sociedad debido a la aplicación directa de algunos de ellos como el descubrimiento de algunas vacunas.

#### Modelos animales en el estudio de la microbiología

La historia de los modelos animales en microbiología es un relato de mitos. En el siglo XVII, Antonie van Leeuwenhoek y Lazzaro Spallazani fueron los primeros en la historia que con sus propios prototipos de microscopio fueron capaces de observar microorganismos. Hasta ese momento, los científicos eran capaces de relacionar síntomas y lesiones específicas, con determinadas enfermedades, pero los agentes causales eran un misterio. Por otro lado, la teoría de los “miasmas” era ampliamente aceptada por la mayoría de patólogos y científicos de la época. Esta teoría proponía la idea de la existencia de efluvios o emanaciones del suelo o las aguas como las causantes de enfermedad. El mero planteamiento de la existencia de criaturas invisibles como agentes causales de enfermedad resultaba ridículo para el pensamiento de la época.

Los animales, en el siglo XVIII eran utilizados para entender el funcionamiento del cuerpo sano y cómo este cambiaba cuando enfermaba. Cuando los microorganismos pudieron ser observados en los proceso alimentarios y asociados a lesiones patognomónicas, su presencia fue asociada a simples coincidencias o justificada como un crecimiento oportunista debido a la degeneración del tejido por la enfermedad.

Los primeros experimentos en los que se emplearon animales fueron aquellos en los que se buscaba la transmisión y replicación de la enfermedad después de inocular tejidos infectados en animales sanos. Sin embargo, estos experimentos no fueron suficientes para convencer a los escépticos que todavía aceptaban de manera amplia la teoría de los miasmas. La teoría microbiana no fue aceptada hasta que Pasteur y Koch

comenzaron a aislar cultivos microbiológicos puros y a reproducir enfermedades específicas mediante la inoculación de estos cultivos a animales sanos.

El uso de animales fue clave en el descubrimiento de multitud de patógenos como *Bacillus anthracis* o *Mycobacterium tuberculosis*. Además del descubrimiento del agente causal de muchas enfermedades importantes, Pasteur introdujo el concepto de la vacunación terapéutica. Pasteur realizó sus experimentos para el desarrollo de vacunas en pollos, perros, conejos y monos y fue el primer científico en emplear analgesia e incluir puntos finales humanitarios en sus protocolos experimentales.

Después de anunciar el descubrimiento de la vacuna frente al ántrax, el director de la revista "Veterinary press" retó a Pasteur a demostrar públicamente su eficacia. Para esto, Pasteur empleó cuarenta y ocho ovejas, dos cabras y doce vacas a los que dividió en dos grupos. Posteriormente, vacunó delante la audiencia a uno de los grupos y dejó el otro grupo como control. Catorce días después de la vacunación, todos los animales fueron inoculados con un cultivo virulento de *Bacillus anthracis* y tan solo veinticuatro horas después casi todos los animales del grupo control habían muerto. Estas demostraciones públicas, se realizaban frecuentemente y dotaban de gran credibilidad a los científicos de la época.

Desde el siglo XIX, los experimentos con animales fueron fundamentales para el avance de la microbiología, virología e inmunología. Los animales de laboratorio fueron fundamentales para el descubrimiento de la inmunidad celular, multitud de toxinas y antitoxinas, las primeras enfermedades zoonóticas, los grupos sanguíneos, la transformación bacteriana, la terapia antibiótica, los antivirales, los antígenos, los anticuerpos monoclonales y un gran número de enfermedades bacterianas y

parasitarias, además, de sus vacunas y tratamientos [Knudsen and Frimodt-Moller, 2001].

#### Modelos animales para el estudio de la transmisión de microorganismos

Tradicionalmente, el estudio de la transmisión de agentes patógenos, víricos o bacterianos, se ha realizado mediante modelos matemáticos que combinan datos epidemiológicos sobre movimientos de animales, fómites, y otros datos de relación entre individuos, con datos sobre prevalencia de la enfermedad en cuestión y sus variaciones. Con el análisis de los datos, se establecen las relaciones estadísticas entre las variables, lo que ha permitido determinar los principales factores que influyen en la transmisión de ciertos agentes patógenos [Thakur *et al.*, 2015]. En la actualidad, la toma de decisiones para el diseño de programas de control se basa en modelos matemáticos que permiten analizar el posible efecto de estas medidas en el control de la transmisión de una enfermedad. Por el momento, no existen modelos establecidos ni generalizados para estudiar la transmisión directa o indirecta de agentes patógenos en modelos animales [Álvarez *et al.*, 2014].

La estandarización de este tipo de modelos se complica aún más cuando se trata del estudio de agentes infecciosos que no se replican o lo hacen con dificultad en modelos animales [Lowen *et al.*, 2006]. En el caso de los agentes víricos la transmisión por aire ha sido estudiada mediante la colocación de cubetas adyacentes y la transmisión directa se resume a cohabitación de animales en el mismo ambiente [Bouvier *et al.*, 2008; Deng *et al.*, 2017]. En estos experimentos las variables en estudio están limitadas a modificaciones del entorno común, mientras que, las variables que afectan a animales de manera individual no pueden ser modificadas [Pica *et al.*, 2012].

La cohabitación de animales en los mismos alojamientos no permite discernir si la transmisión entre individuos ocurre por el contacto directo entre estos o por el contacto de los animales sanos con los efluvios o excreciones de los animales infectados, más aún cuando algunas especies usadas en experimentación animal, como los roedores, presentan comportamientos como la coprofagia.

El efecto del contacto con fluidos contaminados se trata de eliminar mediante modelos matemáticos que emplean datos de transmisión de enfermedades. Estos datos están basados en la introducción de animales sanos en alojamientos antes ocupados por animales infectados. Los modelos obtenidos presentan una variación alta y reproducibilidad relativamente baja [*Bravo de Rueda et al.*, 2015].

El contacto directo entre animales es una de las principales vías de transmisión de agentes patógenos bacterianos y víricos [*Pacheco et al.*, 2012; *van Bunnik et al.*, 2012]. Los modelos animales de transmisión empleados en la actualidad se diseñan principalmente para el desarrollo de vacunas. En estos experimentos se evalúa si se reduce el desarrollo de la enfermedad en los animales vacunados, pero no se analizan en profundidad los factores que influyen en la transmisión directa de los microorganismos [*Edenborough et al.*, 2012]. En los últimos años, el estudio de la transmisión de bacterias patógenas adquiere una gran relevancia debido al incremento de la resistencia a antibióticos, ya que si estas bacterias se transmiten y llegan a causar enfermedad su tratamiento es muy complicado e incluso imposible.

*La Resistencia a antibióticos y el microbioma*

La resistencia a antibióticos es una amenaza mundial para la salud humana y animal que pone en peligro la medicina actual y aceleran el retroceso a una era pre-antibiótica. Tradicionalmente los ambientes nosocomiales han sido identificados como el principal foco de aparición de resistencias a antibióticos, aunque cada vez se descubren nuevos ambientes no clínicos que se identifican como importantes focos de diseminación de determinantes de resistencia (Wright, 2007).

La presión selectiva causada tanto por el uso como por el mal uso de antibióticos en medicina humana y animal ha contribuido de manera significativa a la expansión exponencial de este fenómeno. El incremento de la resistencia a antibióticos y por tanto la dispersión de determinantes de resistencia están directamente relacionada con la transmisión de bacterias entre personas, animales y el medio ambiente. La diseminación de determinantes de resistencia puede ocurrir no solo por la transmisión de bacterias entre individuos sino también por la transmisión horizontal de genes entre bacterias incluso de diferentes especies [Gonzalez-Zorn and Escudero, 2012].

La adquisición de nuevos genes de resistencia en bacterias puede ocurrir mediante transferencia horizontal de genes por medio de tres mecanismos principales: conjugación, transducción y transformación. La conjugación bacteriana es la transmisión de material genético de una célula a otra célula, frecuentemente mediada por plásmidos que portan su propia maquinaria de replicación. La transducción es el resultado de la adquisición de material genético de un virus, porque el virus codifica para el gen o porque por error de empaquetamiento el virus ha codificado y transmite ADN no vírico.



Finalmente, la transformación es la capacidad de una bacteria de integrar ADN exógeno del ambiente en su propio genoma. Estos métodos de transmisión de material genético entre organismos son difíciles de detectar en la naturaleza, siendo fundamentalmente estimados mediante experimentos *in vitro* de laboratorio. La conjugación bacteriana será analizada con más profundidad en esta introducción más adelante [Brinkac *et al.*, 2017].

Según se estima en "El proyecto del microbioma humano", la transferencia horizontal de genes es 25 veces mayor en el intestino que en otros ecosistemas como el suelo [The Human Microbiome Project Consortium, 2012]. Según estas estimaciones se detectaron unos 13.500 intercambios de media genéticos por transferencia horizontal en el intestino por muestra analizada mediante secuenciación, siendo los más frecuentes aquellos intercambios que relacionan bacterias de la microbiota humana con aquellas de origen animal y de alimentos [Smillie *et al.*, 2011]. Por estas razones, un incremento de los niveles de resistencia a antibióticos de manera general afectará directamente al incremento de los niveles medios de bacterias resistentes en el intestino que pueden verse favorecidos por las diferentes presiones selectivas debido al contacto con antibióticos [Jernberg *et al.*, 2010].

Por tanto, la microbiota intestinal que habita en el cuerpo de los seres humanos y animales tiene un papel fundamental como reservorio de determinantes de resistencia a antibióticos, así como una particular relevancia para la salud y la medicina. La disminución de la susceptibilidad a los antibióticos por parte de las bacterias de la microbiota implica no solo un mayor riesgo de ineficacia terapéutica en el caso de una infección, generándose en el paciente un reservorio capaz de almacenar y dispersar

determinantes de resistencia. Además, la constante aparición de nuevos mecanismos de resistencia contribuye a exacerbar cada vez más este problema, ya que en un mismo microecosistema se acumulan multitud de genes de resistencia frente a una gran cantidad de familias antibióticas (Brinkac, Voorhies, Gomez, & Nelson, 2017).

Por todo esto, se considera que el microbioma intestinal es uno de los principales reservorios de genes de resistencia. Se estima que este está constituido por 3,3 millones de genes no redundantes, que representan un conjunto de genes 150 veces más grande que el total de un ser humano [Qin *et al.*, 2010]. La amplia diversidad genética y la complejidad del microecosistema, que combina aproximadamente  $10^{14}$  bacterias de más de 400 filos diferentes, resulta en un ambiente perfecto para el intercambio de material genético entre comensales y bacterias en tránsito [Eckburg *et al.*, 2005]. Esta riqueza genética abarca también determinantes de virulencia y genes de resistencia que son transferidos entre bacterias comensales, bacterias en tránsito y posibles bacterias patógenas [Liu *et al.*, 2012]. Así mismo estos procesos se han observado en animales de producción donde el uso de antibióticos es frecuente e incluso en algunos países se siguen empleando como promotores del crecimiento. Aunque en los últimos años el uso de antibióticos ha disminuido, el resistoma encontrado en estos animales es abundante y variable [Munk *et al.*, 2018].

#### *Desarrollo y evolución de los modelos animales en el estudio de la microbiota*

El primer trabajo en el campo de la microbiota no estaba relacionado con investigación con modelos animales. Theodor Escherich, médico austriaco alemán que es considerado como el padre de la pediatría, fue uno de los primeros científicos interesados en el papel de las bacterias intestinales. Su trabajo estuvo centrado en las enfermedades infantiles

debido a la alta mortalidad de la época. Escherich confirmó la importancia de ciertas bacterias en la nutrición neonatal, e influenció a sus compañeros a trabajar con bacterias procedentes de la leche de vaca.

Escherich caracterizó muchas de las bacterias de la leche materna y del intestino de los niños. En concreto, definió el papel crítico de *Bacterium coli commune* (ahora conocida como *E. coli*) y de *Bacterium lactis aërogenes* (ahora conocida como Kp) en la digestión de la lactosa, la fermentación, la producción de gas y la defensa frente a bacterias patógenas (fenómeno conocido como: “Resistencia a la colonización”). Desde la muerte de Escherich en 1911 hasta la actualidad, el estudio de la microbiota intestinal ha adquirido un gran auge asociado a las nuevas técnicas de identificación bacteriana y al uso de modelos animales.

Escherich afirmaba que el mejor modelo para estudiar la microbiota comensal que coloniza el intestino del hombre eran las heces de bebés lactantes. Este modelo es una representación simple de un sistema complejo [Denayer *et al.*, 2014]. Con su trabajo caracterizó las poblaciones dependiendo de la parte del intestino y realizó multitud de experimentos *invitro*. Cuando Escherich trató de replicar sus resultados en humanos adultos o animales observó que existía una gran variación entre cada réplica, lo que le llevó a desestimar este tipo de modelos.

Por tanto, el primer reto del desarrollo de modelos animales en el estudio de la microbiota fue la estandarización. Con la creación de los animalarios de investigación, se inició la selección y cría de roedores que dio lugar a la primera línea endogámica en 1930. La selección cruzada de líneas de ratón causó la aparición de variaciones genéticas intrínsecas a cada línea endogámica. Estas variaciones resultaron en la aparición de

modelos específicos para enfermedades inducidas genéticamente. El elevado coste de estas líneas requirió de la creación de animalarios de mayor nivel de bioseguridad, apareciendo las primeras líneas libres de patógenos específicos.

Al mismo tiempo gracias a este desarrollo, el interés en la función de la microbiota intestinal se incrementó y varios grupos comenzaron a experimentar con nuevas líneas de trabajo comparando líneas de ratón colonizadas con animales gnotobióticos [Williams, 2014].

A mediados del siglo XX, se publicó la revisión titulada “germfree vertebrates: present status” que resumía todos los resultados obtenidos mediante el uso en investigación de modelos gnotobioticos [Reynier, 1959]. La ausencia de microbiota intestinal está relacionada con importantes procesos biológicos como la deficiencia nutricional y la alteración de parámetros de bioquímica sanguínea. La anatomía intestinal y el sistema linfático sufren grandes modificaciones, así como, los parámetros inmunológicos (p.e.: los niveles de inmunoglobulina). Todas estas modificaciones afectan a la respuesta inmune frente a agentes infecciosos, pero inesperadamente también reducen la frecuencia de aparición de ciertas enfermedades intestinales. El potencial de los animales gnotobioticos fue explotado por muchas investigaciones. Por ejemplo, a mediados de 1960 Russell W. Schaedler desarrolló un inóculo compuesto de microbiota específica denominado “Schaedler Flora” para colonizar de manera estandarizada ratones libres de microorganismos.

En los mismos años, la creación del primer ratón transgénico (1976) y el primer ratón knockout<sup>5</sup> mediante ingeniería genética (1987) incrementaron el potencial de los modelos animales en el estudio de multitud de enfermedades. El descubrimiento de los modelos knockout, tuvo una especial relevancia en nutrición, gastroenterología, neurología, endocrinología e inmunología. En concreto, estos modelos sirvieron para profundizar en el campo de las enfermedades autoinmunes, la diabetes, la artritis, los problemas gastrointestinales, el cáncer e incluso el autismo.

Actualmente, la disponibilidad del genoma del hombre y del ratón, junto con el reducido coste de las herramientas de secuenciación, han impulsado el desarrollo de multitud de modelos que se ofrecen en el mercado. Sin embargo, siempre existirán multitud de diferencias intrínsecas entre la anatomía del intestino del hombre y el ratón (Imagen 2), así como diferencias en la composición de la microbiota las cuales se deben tener en cuenta en el desarrollo de modelos animales para cualquier proyecto de investigación.

#### *Anatomía comparada entre el humano y el ratón*

Los mamíferos actuales son el resultado de 350 millones de años de evolución. Los humanos y los ratones han cohabitado durante más de 15.000 años [Weissbrod et al., 2017]. Por esto, aunque el intestino de los mamíferos presenta muchas diferencias entre las diferentes especies, todavía existen importantes similitudes anatómicas y fisiológicas (Imagen 2). El hombre y el ratón comparten la anatomía general del tracto digestivo que se divide en boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso y ano. También la composición del tejido seccional del intestino delgado y grueso es

---

<sup>5</sup> El knockout (en español, noqueo) de genes es una técnica de ingeniería genética que consiste en suprimir/inactivar un gen o conjunto de genes en un organismo.

similar, así como, la presencia de células importantes en el intestino delgado y el colon. Sin embargo, el tracto intestinal de los seres humanos y los ratones también presenta diferencias importantes [Nguyen et al., 2015].

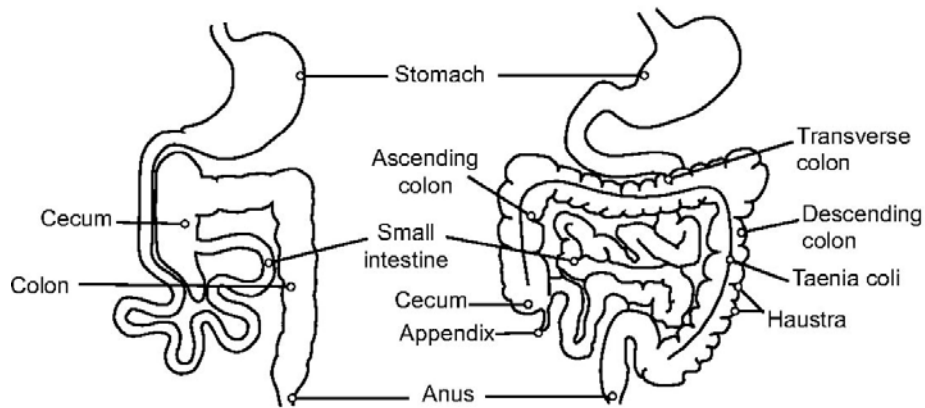


Imagen 2. Diferencias anatómicas entre el intestino del ratón y el humano. Adaptado de [Nguyen et al., 2015]

El estómago del ratón tiene una porción no glandular que no está presente en los humanos, y el apéndice humano no está presente en el ratón. El importante papel del intestino delgado en la digestión humana y la nutrición, ha resultado en diferencias de tamaño y forma en este órgano entre las dos especies. Esto se destaca cuando se compara la proporción de la superficie del intestino delgado frente al colon de las dos especies, siendo 22 veces más grande en humanos que en ratones. Esta diferencia es causada no solo por el tamaño más grande del intestino delgado comparado con el tamaño del colon en los humanos, sino también por la estructura anatómica de la pared intestinal. La pared intestinal de los ratones presenta vellosidades más altas sin pliegues en la mucosa, a diferencia de la humana, que presenta vellosidades más cortas y pliegues de la mucosa [Nguyen et al., 2015].

La amplia composición de la dieta de los ratones, que incluye más vegetales y semillas, requiere una cámara de fermentación más grande. El ciego de los ratones permite la

degradación de compuestos no digeribles por la microbiota intestinal. Estos procesos de fermentación bacteriana que ocurren en el ciego de los ratones son críticos para la producción de vitamina K y B y otros nutrientes que los ratones luego reabsorberán por coprofagia. Por el contrario, los procesos de fermentación en humanos ocurren en el colon. A través del proceso de fermentación, la microbiota colónica es capaz de producir una amplia gama de compuestos que luego se absorben directamente en el colon. Esto explica por qué el colon humano es más grande, arrugado y dividido en tres secciones diferentes: colon ascendente, transversal y descendente. Además, esta forma es causada por la presencia de haustrum y taenia coli que están ausentes en el colon del ratón [Nguyen et al., 2015].

#### *El microbioma del ratón*

Bacteroidetes y Firmicutes son los dos filos mayoritarios en la microbiota intestinal del hombre y el ratón [Eckburg et al., 2005; Hillman et al., 2017]. Sin embargo, si se analiza en profundidad el microbioma de ambas especies existe un gran número de géneros que no están presentes en ambas [Ley et al., 2005]. También existe una gran variación en la cantidad relativa de cada especie, donde por ejemplo, los filos Alistipes y *Clostridium* se encuentran en mayor abundancia en la microbiota de ratones.

Existen muchas diferencias entre los métodos aplicados para identificar los componentes de la microbiota intestinal de ambas especies. Mientras que en los trabajos realizados en humanos prevalecen los estudios de secuenciación masiva, en los de modelos murinos el sistema de análisis más empleado es la secuenciación del ADNr 16S. Además, las muestras empleadas en los análisis son con frecuencia diferentes, en

los estudios del microbioma murino se analizan principalmente muestras de contenido cecal, mientras que en humanos suelen analizarse heces [Nguyen *et al.*, 2015].

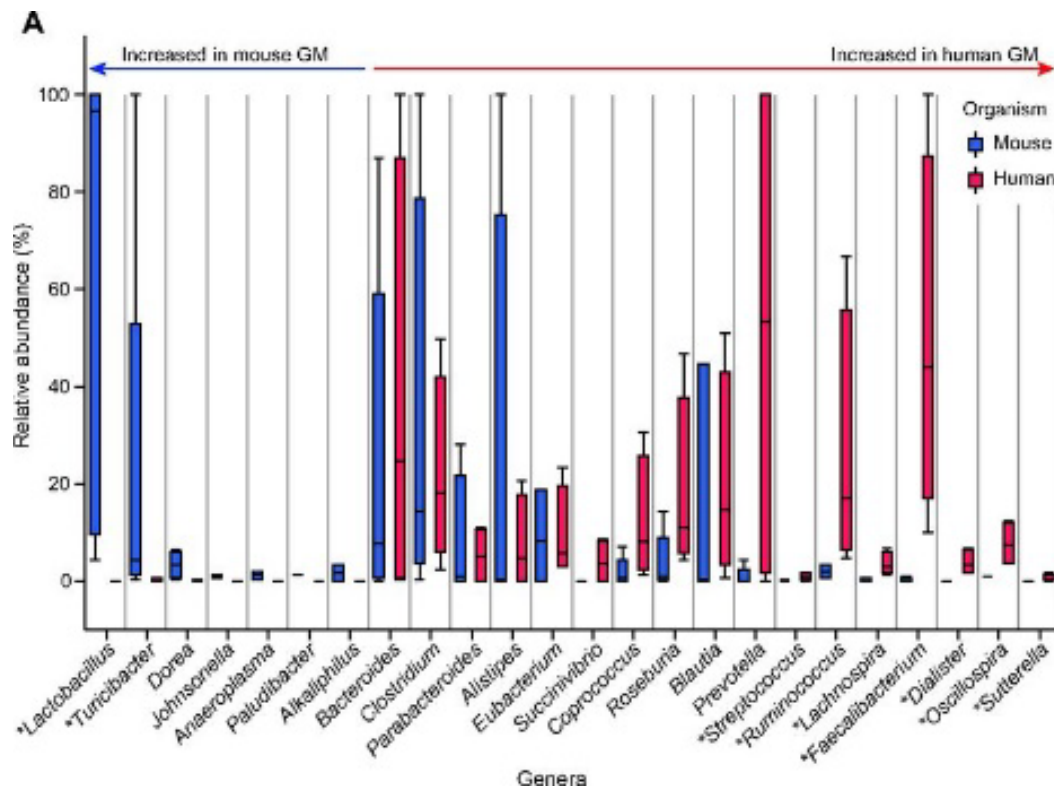


Figura 1. Meta-análisis de los datos publicados de secuenciación del 16S ADNr de ratones y humanos realizada por Nguyen y colaboradores (Nguyen *et al.*, 2015)

Los principales factores que influyen en la estabilidad de la microbiota son el alojamiento y la alimentación. Por ejemplo, los cambios en la alimentación afectan directamente a la composición de la microbiota. Cabe destacar que los modelos de la línea C57BL6 son frecuentemente empleados en el estudio de la obesidad, para lo que son alimentados con una dieta de alto contenido en grasa, observándose también importantes modificaciones en su microbiota. Estos estudios han servido para identificar el papel de ciertas bacterias en el desarrollo de esta enfermedad [Turnbaugh *et al.*, 2008]. Por otro lado, los alojamientos empleados en animales de laboratorio



reducen el contacto de estos animales con factores externos lo que disminuye las variaciones en la microbiota en comparación con el ratón silvestre. La cohabitación con otros individuos, como los progenitores, incrementa la homogeneización de la microbiota entre camadas debido a la práctica de la coprofagia [Soave and Brand, 1991].

La línea C57BL6 es una de las más empleadas en desarrollo de modelos para el estudio de enfermedades relacionadas con la microbiota. El elevado número de variables knockout y la resistencia de la línea frente a inoculaciones de cultivos bacterianos externos (p.e.: inóculos de microbiota humana), la posicionan como la línea ideal para el desarrollo de este tipo de modelos [Turnbaugh et al., 2008].

#### *Resistencia a la colonización y el efecto de los antibióticos*

Sin embargo, aunque existan elevados flujos de intercambio genético la colonización por parte de una bacteria externa del intestino es muy compleja cuando existe una microbiota estable. Este fenómeno se conoce como “Resistencia a la colonización” e impide que, por ejemplo, bacterias patógenas que accedan al cuerpo por vía oral se instauren en el intestino y lleguen a causar enfermedad. Este fenómeno es de gran importancia en los hospitales, dado que en los pacientes, la capacidad de resistir a la colonización es determinante ya que, por un lado, impide que en ellos se puedan replicar bacterias patógenas y estos actúen como reservorio y, en segundo lugar, porque estos pacientes pueden presentar con más frecuencia estados de inmunosupresión que aumentan el riesgo de enfermedad [Kim et al., 2017].

Los antibióticos son utilizados de manera profiláctica y curativa en los hospitales diariamente. Su uso asegura la supervivencia de pacientes frente a enfermedades infecciosas bacterianas que en otra época hubieran significado la muerte. Sin embargo,

la elevada presión selectiva que existe en estos ambientes ha propiciado la aparición de cepas multirresistentes que se diseminan de manera endémica entre los pacientes de un mismo hospital [Lopez-Camacho et al., 2018]. Por otro lado, se ha observado como el uso de antibióticos altera la microbiota intestinal, lo que disminuye la resistencia a la colonización incrementando el riesgo a enfermar de estos pacientes [Tischendorf et al., 2016].

Para estudiar en profundidad los efectos de los antibióticos sobre la resistencia a la colonización se han desarrollado diferentes modelos animales. Estos modelos buscan replicar, analizar y predecir lo observado en estudios epidemiológicos fundamentalmente realizados en hospitales. Uno de los modelos más replicados es el de *Clostridium difficile* en ratón para estudiar el efecto de las diferentes terapias antibióticas en la colonización, el tratamiento y la descolonización [Al-Nassir et al., 2008; Lewis et al., 2015]. En este trabajo se profundizará más adelante en los modelos animales para el estudio de la capacidad de colonización de una de las bacterias nosocomiales más relevantes.

#### El impacto en la sociedad de los modelos animales para el estudio de enfermedades infecciosas

Los microorganismos son los agentes causantes de enfermedades infecciosas. Hace solo cien años, los humanos atribuían enfermedades infecciosas a las "miasmas" presentes en el aire, el agua o las condiciones internas del cuerpo. La teoría de los "miasmas" (la antigua palabra griega para la contaminación) sostenía que las enfermedades como el cólera o la Muerte Negra fueron causadas por compuestos que emanan de la materia orgánica en descomposición [Last, 2007]. La aceptación de la teoría de los gérmenes de

las enfermedades infecciosas se basó principalmente en el trabajo de Louis Pasteur y Robert Koch.

Pasteur se doctoró en química en la especialidad de cristalografía. Se interesó por la naturaleza biológica de la fermentación debido a su relevancia económica en la industria del vino y la cerveza. A partir de este interés, desarrolló el proceso de pasteurización en colaboración con Claude Bernard. Como microbiólogo, junto con su grupo, identificó las siguientes especies bacterianas: *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Clostridium septicum*, *Bacillus anthracis* y *Pasteurella multocida* asociadas a varias enfermedades humanas y animales. Sin embargo, Pasteur fue reconocido internacionalmente en ese momento por el desarrollo y la aplicación con éxito de una vacuna terapéutica contra la rabia humana. Basados en el trabajo de Pasteur y solo después de la publicación de "Sobre el principio antiséptico de la práctica de la cirugía" por Joseph Lister, los médicos comenzaron a creer en la importancia del lavado de manos y la esterilización de los instrumentos quirúrgicos, práctica que ha salvado multitud de vidas hasta el momento.

Robert Koch era un médico rural interesado en bacteriología y patología. Koch fue galardonado con el premio Nobel en 1905 por el descubrimiento del agente causante de la tuberculosis, *Mycobacterium tuberculosis* y el del Cholera, *Vibrio cholerae*. Su trabajo sobre el aislamiento y el cultivo puro de bacterias se culminó con la publicación de los "postulados de Koch". Koch fundó su propia escuela de microbiología y viajó por todo el mundo estudiando diversas enfermedades. Dos de sus estudiantes más brillantes, Emil von Behring y Paul Ehrlich, fueron galardonados con el Premio Nobel en 1901 y 1908. Behring descubrió las primeras terapias de suero para la difteria y el tétanos (a las que también contribuyeron Kitasato Shibasaburo y Emilie Roux) y Ehrlich

fue premiado por sus contribuciones a la inmunología. El segundo fue nuevamente nominado en 1912 por el descubrimiento de Salvarsán como el primer tratamiento efectivo contra la sífilis.

A pesar de que la cantidad de animales utilizados por Pasteur, Koch y sus colegas fue mucho mayor que en los siglos anteriores, el efecto rápido, profundo y permanente en la salud pública, la cirugía y la medicina de estos descubrimientos fue suficiente para mostrar a la opinión pública la importancia del uso de animales en la investigación. De esta forma, los argumentos abolicionistas basados en el bajo progreso médico obtenido, fueron obsoletos y los anti-viviseccionistas tuvieron que aceptar la importancia del uso de animales en la investigación. Además, la introducción de roedores como animales de laboratorio, junto con la disminución del uso de perros y otros animales de compañía, favoreció la aceptación de la ciencia basada en animales que se consideraron plagas. Desde 1901, el 85% de los premios Nobel otorgados en la categoría de fisiología o medicina se otorgaron a científicos que basaron su investigación en modelos animales.

### El siglo XX y las "3R"

El movimiento por los derechos de los animales volvió apoyado en el pensamiento ético de varios autores del siglo XX. La publicación de los libros "Animal Liberation"<sup>6</sup> en 1975 "The Case for Animal Rights"<sup>7</sup> en 1983 por los filósofos Peter Singer y Tom Regan impactaron a la comunidad científica y social. La "Ética animal" apareció como un nuevo

---

<sup>6</sup> "Animal Liberation": A New Ethics for Our Treatment of Animals (en español: Liberación animal) es un libro del filósofo australiano Peter Singer, publicado en 1975. Es ampliamente considerado dentro del movimiento de los derechos de los animales como uno de los elementos fundacionales de sus ideas filosóficas. Fuente: Wikipedia.

<sup>7</sup> "The Case for Animal Rights" publicado el 1983 (en español: La causa de los derechos animales) es un libro del filósofo americano Tom Regan. Influyó significativamente los movimientos de lucha por los derechos de los animales.

campo de conocimiento y los activistas por los derechos de los animales comenzaron a fundar sus críticas a los experimentos animales basados en su inmoralidad intrínseca. Si bien Singer no consideró que todo tipo de experimentación con animales fuera moralmente incorrecta, Regan afirmó que no hay un final que justifique el uso de ningún ser sensible. Por eso un acuerdo entre los defensores de la investigación animal y los defensores de los derechos de los animales fue fundamental para el desarrollo de una ciencia más humana.

Dos pioneros de este campo de trabajo, el zoólogo William Russel y el microbiólogo Rex Burch, fueron los autores del principio de las "Tres R" (referido a reemplazo, reducción y refinamiento). Este principio estableció un nuevo marco para la investigación moderna basada en animales. A pesar del avance en el campo y la mejora en la regulación del uso de animales, todavía sigue habiendo ataques radicales y acciones terroristas como asalto a instalaciones de animales, bombardeos de automóviles y correos y el envío de cuchillas de afeitar contaminadas con SIDA, del mismo modo que muy posiblemente existan investigadores que no actúen de manera ética y moral en el empleo de animales en sus investigaciones.

Hoy en día, casi todos los países occidentales basan su regulación en el principio de las "tres R". Existen severos mecanismos reguladores para controlar el uso de animales en la investigación y los proyectos deben ser evaluados por comités de ética multidisciplinarios.

El papel vital de la investigación basada en animales sobre el avance científico, y específicamente la salud pública, es ampliamente aceptado y aún se esperan las contribuciones futuras. Además, existe un compromiso dentro de la comunidad

científica para avanzar en el bienestar animal y buscar alternativas al uso animal en las ciencias de la vida. Por el contrario, en los países emergentes existen importantes deficiencias en la regulación del uso de animales en la investigación y no hay datos públicos sobre la cantidad de animales que se están utilizando.

### La resistencia a antibióticos: El reto de la medicina del siglo XXI

A diario, en hospitales de todo el mundo, ingresan pacientes con enfermedades infecciosas causadas por bacterias multiresistentes a los antibióticos. Estos pacientes suponen un desafío tremendo para los médicos especialistas que se encuentran sin recursos antibióticos para el tratamiento de estas enfermedades. Esto también ocurre a diario en clínicas veterinarias y en explotaciones ganaderas donde los veterinarios se encuentran cada vez de una manera más frecuente con aislados clínicos resistentes a la gran mayoría de antibióticos disponibles en el mercado. Debido al impacto sobre la salud humana y a la necesidad de investigación de nuevas terapias y métodos de control, las principales bacterias patógenas de ambientes nosocomiales resistentes a antibióticos se han agrupado dentro del acrónimo ESKAPE y son: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Enterobacter* spp. Es importante destacar que estas bacterias son patógenas oportunistas, que se encuentran tanto en animales como personas, causando los mayores problemas en individuos inmunocomprometidos y pacientes hospitalizados [Wyres and Holt, 2018].

Cada una de las especies que forman el grupo ESKAPE presenta resistencia intrínseca a uno o varios antibióticos, siendo frecuente encontrar cepas o clones que han acumulado determinantes de resistencia para un gran número de antibióticos. Los componentes

Gram Negativos del grupo son considerados una gran amenaza debido a la aparición frecuente de cepas que son resistentes a todos o casi todos los antibióticos conocidos.

La acumulación de determinantes de resistencia en estas bacterias ocurre principalmente por transferencia horizontal de genes [*Pendleton et al.*, 2013]. Una de las especies bacterianas con mayor plasticidad y en la cual se han detectado multitud de genes de resistencia diferentes e incluso mucho antes que en otras especies es Kp [*Wyres and Holt*, 2018].

Aunque Kp es considerado un patógeno oportunista, cada vez es más frecuente encontrar cepas virulentas asociadas a multirresistencia. La mayoría de los aislados de Kp resistentes a múltiples antibióticos, que producen  $\beta$  lactamasas de espectro extendido y/o carbapenemasas en combinación con determinantes de resistencia a quinolonas y aminoglucósidos, suelen pertenecer a clones particulares que pertenecen a ST conocidos y ampliamente distribuidos. Cuando se analizan estos clones mediante técnicas de secuenciación y se buscan similitudes entre sus genomas, estos se agrupan en torno a los clones del ST mayoritario 258. Este ST está adquiriendo una gran relevancia en ambientes nosocomiales siendo el causante de brotes clínicos en hospitales de todo el mundo [*Bialek-Davenet et al.*, 2014].

La adquisición de genes de resistencia por parte de estos STs se ha correlacionado con el incremento de la virulencia las mismas. La capacidad de adquirir nuevos mecanismos de resistencia mediante transferencia horizontal de genes y adaptarse al coste biológico que estos suponen con facilidad es una de las características de estas cepas.

Además, estos clones son capaces de diseminar los mecanismos de resistencia adquiridos a otras bacterias de su entorno. Esto supone un gran riesgo cuando estas

bacterias acceden a un hospital y se diseminan, causando un brote clínico, colonizando nuevos pacientes y dispersando el mecanismo de resistencia entre las bacterias de la microbiota de estos [Hennequin and Robin, 2016].

#### *Klebsiella pneumoniae* y la resistencia a antibióticos

La resistencia a nuevos antibióticos en ocasiones ocurre por mutaciones cromosómicas, sin embargo, en esta bacteria el principal mecanismo de adquisición de resistencia a antibióticos es la transmisión horizontal de genes. Cabe destacar que Kp tiene el dudoso honor de ser la bacteria en la que algunos de los genes resistencia más relevantes han sido detectados por primera vez en plásmidos móviles. Entre estos genes cabe resaltar *SHV*, *TEM*, *CMY*, *qnrA*, *qnrB*, *KPC*, *OXA48* y *NDM1*. Todos ellos ya han sido descritos en diferentes plásmidos en todo el mundo y están diseminados en muchas de las otras bacterias del grupo ESKAPE. Aunque es muy complicado definir con exactitud el flujo de genes, plásmidos y bacterias que han llevado a la movilización y dispersión de estos genes de resistencia, es importante resaltar los casos particulares de *qnrA* y *OXA48* ya que ambos genes provienen de ambientes marinos, fueron adquiridos por Kp y posteriormente transferidos a otras bacterias del grupo ESKAPE. Por todo esto, es necesario profundizar en el papel de esta bacteria en la diseminación y transmisión de determinantes de resistencia [Wyres and Holt, 2018].

Otro de los aspectos que demuestran la capacidad de adaptación de Kp es su presencia en diversos ambientes. Esta bacteria ha sido detectada en la microbiota intestinal de mamíferos, aves y peces y también ha sido encontrada en ambientes acuáticos, en el suelo y en plantas. En la actualidad, se encuentra perfectamente adaptada a vivir en ambientes de alta presión antibiótica, como los hospitales, donde se disemina



colonizando nuevos individuos no siendo detectada hasta que causa enfermedad de manera oportunista [*Piperaki et al.*, 2017].

Por todo lo descrito hasta ahora, esta bacteria es actualmente un reto en el campo de las enfermedades infecciosas, siendo considerada endémica en Italia, Grecia y Turquía y causando brotes epidémicos en el resto de países de la Unión europea. Las infecciones causadas por Kp están asociadas con mortalidades del 40% y 50%, particularmente entre pacientes críticos y trasplantados. En la actualidad, no existe un tratamiento optimizado y consensuado entre la comunidad médica. La combinación de terapias, que incluyen antibióticos de último recurso para el tratamiento de esta bacteria como la Colistina, la Fosfomicina y la Tigeciclina, es la más frecuente [*Bassetti et al.*, 2018].

Particularmente, Kp ha tenido un papel fundamental en la dispersión de genes de resistencia a carbapenemas. En la actualidad, es muy poco frecuente aislar esta bacteria sin las carbapenemasas KPC u OXA48 en ambientes hospitalarios, siendo fundamental para su adaptación a estos. ST epidémicos como el 258 no presentan un gran número de genes de virulencia, los cuales suelen ir asociados en grandes plásmidos, y se ha demostrado en modelos animales de infección nasotraqueal que no causan enfermedad en individuos inmunocompetentes. Sin embargo, estos son capaces de colonizar nuevos individuos gracias a la variabilidad de la cápsula que los rodea, de manera que pueden evadir el sistema inmune, desarrollar biofilms y evitar la fagocitosis. La cápsula tiene un papel fundamental en la colonización de nuevos individuos que debe ser estudiado en detalle en el futuro [*Gomez-Simmonds and Uhlemann*, 2017].

## El papel de los antibióticos en la diseminación de *Klebsiella pneumoniae*

Como se ha descrito antes el intestino está dominado por bacterias anaerobias estrictas que pertenecen a los filos Firmicutes y Bacteroidetes. Experimentos realizados en los años 50 y 60 del siglo pasado en modelos animales demostraron como estos filos son fundamentales en la resistencia a la colonización frente a enterobacterias. Por ejemplo, se observó cómo tratamientos con Estreptomicina permitían la infección oral con *Salmonella enterica* y *E. coli* al reducir la presencia de especies de estos filos. Por otro lado, estudios epidemiológicos han demostrado como la terapia antibiótica es un factor de riesgo para la adquisición de Kp productora de carbapenemasas (CPKp). Esto sugiere que la administración de antibióticos, especialmente los de amplio espectro, causa una alteración temporal de la microbiota que permite a esta bacteria colonizar con mayor facilidad el intestino de nuevos individuos. Estudios de los últimos años, parecen indicar que la reducción de bacterias productoras de butirato altera el metabolismo de las células epiteliales del intestino y aumenta la oxigenación del mismo lo que favorece el crecimiento de enterobacterias anaerobias facultativas que aprovechan ambas vías metabólicas [Olsan et al., 2017].

El efecto de los antibióticos sobre la capacidad colonizadora de CPKp ha sido estudiado en diferentes trabajos. En uno de estos trabajos se observa como la administración de un tratamiento de tres días de Clindamicina, Piperacilina-Tazobactam o Tigeciclina dos días antes de inocular por vía oral un cultivo de Kp favorece de manera significativa la persistencia y la colonización. Sin embargo, después de la administración de Ertapenem, Cefepime y Ciprofloxacina no se observó este efecto, pues, los niveles se mantienen elevados durante 5 días y comienzan a disminuir de manera exponencial. Al mismo

tiempo se analizaron los cambios sobre la microbiota, en concreto, la Clindamicina, el Piperacillin-Tazobactam y el Ertapenem disminuyeron significativamente las concentraciones de *Bacteroides* spp. anaerobios, mientras que, con la Tigeciclina, el Cefepime y la Ciprofloxacina no se observó ningún efecto. Es también destacable que todos los antibióticos, menos la Clindamicina y el Cefepime, redujeron la población de bacilos anaerobios facultativos Gram Negativos. [Perez et al., 2011; M J Pultz and Donskey, 2007; N J Pultz et al., 2005].

Cuando se profundiza en la importancia de la dosis infecciosa y la dosis antibiótica sobre la persistencia y la colonización de Kp, se observa que aquellos antibióticos con más efecto frente a bacterias anaerobias de la microbiota favorecen la colonización independientemente de inóculo. Sin embargo, antibióticos con espectro variable frente a enterobacterias dependerán de la dosis y de la sensibilidad del patógeno colonizante [Hoyen et al., 2003].

## Introducción a los modelos animales desarrollados en este trabajo

### Modelo animal para el estudio de la colonización por *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas

Las cepas de CPKp se han convertido en una de las amenazas más críticas para la salud de los pacientes hospitalizados, particularmente en ambientes que presentan cepas multirresistentes endémicas [Nordmann *et al.*, 2009]. Estas bacterias resistentes a múltiples fármacos están distribuidas globalmente y el papel relevante en la diseminación de los determinantes de resistencia, especialmente plásmidos que portan genes codificantes de carbapenemasas, se ha descrito previamente en este trabajo. La rápida propagación de esta bacteria patógena oportunista ha hecho de su control una prioridad para la medicina moderna, ya que la terapia con triple antibiótico es a menudo la última opción de tratamiento disponible [Jacobs *et al.*, 2017; Souli *et al.*, 2010].

Las medidas de control se basan en la detección rápida de pacientes colonizados, el establecimiento de precauciones de contacto y el refuerzo de los procedimientos de higiene [Nordmann and Poirel, 2014]. Dentro de los tres grupos principales de carbapenemasas [(*K. pneumoniae* carbapenemases (KPC), oxacillinase-48 type (OXA48) y metallo- $\beta$ -lactamases], es importante destacar que OXA48 se ha difundido ampliamente en Europa, África del Norte, Turquía, Arabia Saudita, Argentina, India y Japón [Lee *et al.*, 2016]. La asociación geográfica entre *bla*<sub>OXA48</sub> y España, Italia y otros países mediterráneos está bien descrita, dado que en 2016, un 74% de las bacterias resistentes a carbapenemas aisladas albergaba este gen de resistencia [Bassetti *et al.*, 2018; Palacios-Baena *et al.*, 2016].

La falta de estudios o modelos de intervención limita el conocimiento real a los estudios retrospectivos o la experiencia profesional. Para el desarrollo del modelo experimental que se presenta en este trabajo se han empleado dos cepas de O48PKp procedentes de un brote del HULP. El primer informe de O48PKp del HULP en Madrid, España, se publicó en 2013, describiendo los orígenes del brote [*Pano-Pardo et al.*, 2013]. Casi diez años después, las medidas de higiene que se implementaron han reducido drásticamente el número de nuevos pacientes colonizados, pero aún no se ha logrado la erradicación del brote [*Pérez-Blanco et al.*, 2018]. En primer lugar, se detectó el ST405 que fue diseminándose por diferentes áreas del hospital. Posteriormente, este fue desplazado por ST11 que comenzó a expandirse de manera abrupta por el hospital. Este último, ST11, está muy relacionado con diferentes clones epidémicos del ST258. Además, la diseminación del gen de resistencia a otras bacterias está incrementando la preocupación de los especialistas.

Los estudios de intervención carecen de la capacidad de controlar todas las variables y dependen en gran medida de la disposición del paciente a participar, lo que impide obtener información fiable que permita implementar nuevas medidas de control y así llegar a controlar y eliminar el brote. Para ello en este trabajo, según el conocimiento de los autores, se ha desarrollado el primer modelo in vivo para investigar la dinámica de colonización de O48PKp que explora el efecto de un antibiótico betalactámico y la frecuencia de conjugación con la microbiota del huésped.

Modelo animal para el estudio de la transmisión de bacterias resistentes a antibióticos por contacto directo.

La importancia del contacto directo en la transmisión de bacterias patógenas ha sido investigada en múltiples ocasiones. Cuando se analizaron las bacterias presentes en las manos de médicos y enfermeras, se aislaron bacterias patógenas de importancia para la salud humana en 1 de cada tres médicos y en 1 de cada 10 enfermeras. Además, si se analiza la similitud de estos aislados con las bacterias presentes en los pacientes se observaron grandes similitudes [*Bauer et al.*, 1990].

Como se menciona en apartados anteriores se conocen sistemas adecuados para analizar la transmisión de enfermedades infecciosas por vía aérea. Los sistemas comerciales disponibles en la actualidad no permiten analizar la transmisión de bacterias por contacto directo, eliminando el contacto con deyecciones, comida y la cama de otros individuos.

Entre los sistemas comerciales disponibles, se pueden mencionar, por ejemplo, los descritos en la patentes US6782845B1 [*Brielmeier*, 2004-08-31], que se refiere a un sistema de cubetas en las que se introduce aire estéril y en el que se cuenta con un animal centinela que se comporta como bioindicador para la detección de partículas infectivas en muestras de aire expirado por otros animales alojados en el mismo sistema. Otro ejemplo se describe en la patente WO2008098297A1 [*Stevenson*, 2008-08-21], que presenta un sistema que cuenta con una cubeta en la que se aloja uno o más animales centinela y que se conecta con otras cubetas adyacentes, todas ellas con aberturas y entradas y salidas de aire (que pueden contar con filtros) de manera que el flujo de aire pasa a través de las cubetas adyacentes y puede estudiarse el paso de los agentes infecciosos hasta los animales centinela.

Por otro lado, para el estudio del contacto directo entre individuos debemos estudiar otro tipo de sistemas donde se puede analizar el comportamiento de los ratones y sus interacciones. El más empleado de estos sistemas es conocido como “behavioral pattern monitor” (BPM) que describieron originalmente Geyer y col. en 1986 [Geyer *et al.*, 1986]. En este caso se trata de una cubeta que tiene una serie de agujeros practicados en el suelo y en las paredes y en la que cada agujero está equipado con un haz de infrarrojos. Mediante la red de infrarrojos que se genera, se detectan los movimientos de los animales y, con ello, se estudia su comportamiento.

En este trabajo, para poder llevar a cabo estudios de transmisión de enfermedades infecciosas mediante interacciones “boca a boca” en los animales de laboratorio, se ha desarrollado un sistema de alojamiento que permite que los animales alojados sigan contactando entre ellos de manera oral, pero impide el contacto con las deyecciones, la cama de otros animales y el alimento o agua de bebida, al mismo tiempo que, permite grabar toda la actividad realizada dentro de la cubeta.

#### Modelos animales para el estudio de compuestos inhibidores de la conjugación

Los genes de resistencia a los antibióticos aparecieron originalmente como un mecanismo de autoprotección para los organismos productores de antibióticos [D’Costa *et al.*, 2006]. La diseminación mundial de bacterias resistentes es una preocupación importante para la salud pública, ya que alrededor de 700,000 personas mueren debido a infecciones causadas por bacterias multirresistentes cada año [Price, 2016]. Los brotes nosocomiales causados por más de un patógeno que comparte el mismo plásmido se describen frecuentemente en la literatura [Bocanegra-Ibarias *et al.*, 2017]. La diseminación de genes de resistencia a antibióticos de último recurso, tales como

*bla*<sub>NDM1</sub> u *bla*<sub>OXA48</sub>, está frecuentemente mediada por conjugación de plásmidos [Bosch et al., 2017; Guo et al., 2016].

La resistencia a antibióticos puede surgir por mutaciones cromosómicas, que se heredan verticalmente, o puede aparecer codificada en elementos genéticos móviles, de los cuales los plásmidos conjugativos son uno de los vehículos más importantes, capaces de conectar bacterias que se encuentran filogenéticamente distantes (Norman, Hansen and Sørensen, 2009). La conjugación permite la transferencia de grandes fragmentos de ADN que en ocasiones contienen ventajas adaptativas, como los genes de resistencia [Smillie et al., 2011].

Estos clones representan un riesgo para la salud pública tanto por la capacidad de causar enfermedades que amenazan la vida como por aumentar la posibilidad de transmisión de esos determinantes de resistencia dentro de la misma especie o en especies diferentes [Werner, 2017]. Los genes de resistencia no sólo son un problema en ambientes médicos, sino también en muchos otros entornos relacionados con la actividad humana: la industria ganadera, el suelo y el agua [Cantas et al., 2013]. Incluso las bacterias del microbioma de los insectos, que actúan como conexión entre las áreas rurales y urbanas, son vectores de genes de resistencia a antibióticos [Zurek and Ghosh, 2014]. El intestino humano es un ecosistema complejo que sirve como reservorio de determinantes de resistencia como ya se ha analizado en este trabajo, en el que la conjugación es un evento común [van Schaik, 2015]. Se ha demostrado que la conjugación se produce de manera natural en el intestino de modelos murinos [García-Quintanilla et al., 2008; Gottig et al., 2015; Lester et al., 2006].



La densidad bacteriana en ambientes intestinales favorece los eventos de transmisión que dependen del contacto celular, como la conjugación. La relevancia de la conjugación en la transmisión de determinantes de resistencia en todos los entornos, especialmente en el intestino, hace que sea necesario encontrar nuevas estrategias para evitar la aparición y propagación de los genes de resistencia.

Los inhibidores de la conjugación (COIN) son compuestos que inhiben la transferencia de plásmidos al afectar la maquinaria conjugativa de estos. Los ácidos grasos insaturados son COIN que afectan la transferencia de varios grupos de plásmidos conjugativos en procedimientos *in vitro* [Fernandez-Lopez *et al.*, 2005; Getino *et al.*, 2015; Getino *et al.*, 2016], sin embargo, estos no se han probado en modelos *in vivo* ni en entornos naturales. Los ácidos grasos insaturados naturales como el ácido linoleico (C18H32O2) y ácido deshidrocrepenínico (C18H28O2) son efectivos para bloquear la conjugación, pero pueden degradarse una vez que entran en contacto con las células bacterianas, lo que afecta su eficacia [Fernandez-Lopez *et al.*, 2005]. Por otro lado, los ácidos grasos insaturados sintéticos con enlaces triples como el 2HDA (C16H28O2) [Getino *et al.*, 2015] son química y biológicamente más estables. Se ha sugerido que 2HDA se integra en la membrana bacteriana y afecta la conjugación al inhibir los componentes esenciales de la maquinaria de secreción [Garcia-Cazorla *et al.*, 2018].

Para evaluar la traslacionalidad de la aplicación de COIN, se empleó un modelo de ratón. Estos modelos se han utilizado ampliamente como sistemas de medicina comparativa para enfermedades humanas (Nguyen *et al.*, 2015). A pesar de que el intestino de los ratones presenta algunas diferencias importantes en comparación con el intestino humano, las similitudes y ventajas de usar este tipo de modelos en microbiología están

fuertemente demostradas científicamente [Faith *et al.*, 2011; Mathur *et al.*, 2012]. El papel clave de la conjugación en la diseminación de plásmidos que albergan genes de resistencia también se ha investigado (Gottig *et al.*, 2015). En este trabajo, utilizamos un modelo murino para probar la efectividad de los COIN en estas condiciones y, por lo tanto, avanzar en las aplicaciones de estos compuestos que podrían ser útiles en áreas tan variadas como el sector de la salud, la industria alimentaria o las aguas residuales.



# Justificación y Objetivos

Si quieres vivir una vida feliz, átalala a una meta, no a una persona u objeto.

ALBERT EINSTEIN



La resistencia a antibióticos compromete el estado de bienestar al poner en peligro la salud única. La transmisión de bacterias resistentes entre personas, animales y medio ambiente ocurre a diario en la naturaleza. El uso de antibióticos ha incrementado los niveles de resistencia en los últimos años hasta alcanzar niveles que nos acercan a una era “pre-antibiótica. Este fenómeno afecta de manera significativa a pacientes inmunocomprometidos, ancianos y niños, incrementando los niveles de mortalidad.

En ambientes hospitalarios bacterias como Kp han acumulado numerosos determinantes de resistencia reduciendo las alternativas terapéuticas. Es precisamente en los hospitales donde controlar la transmisión y la colonización de nuevos individuos alcanza una relevancia crítica. La diseminación de plásmidos que codifican determinantes de resistencia para antibióticos de último recurso agrava esta situación.

A pesar de la relevancia histórica de los modelos animales en la investigación en enfermedades infecciosas, estos han sido sustituidos por modelos epidemiológicos que carecen de capacidad de intervención. Nuevas alternativas deben ser desarrolladas para comprender la ecología de las bacterias resistentes a antibióticos, así como los plásmidos que portan.

Por todo ello, en esta tesis doctoral se plantearon los siguientes objetivos:

- 1- Desarrollar una serie de modelos animales basados en la evidencia que permitan profundizar en el estudio de la colonización y transmisión de bacterias resistentes a antibióticos.
- 2- Estudiar *in vivo* la capacidad inhibidora de la conjugación del 2HDA2.



# Materiales y métodos

**“Nada tiene tanto poder para ampliar la mente como la capacidad de investigar de forma sistemática y real todo lo que es susceptible de observación en la vida”.**

**Marco Aurelio**





## Procedimientos con animales

Todos los procedimientos con animales fueron autorizados por el Comité de Bienestar Animal de la Comunidad de Madrid, después de ser aprobados por el Comité Ético de la Facultad de Veterinaria y el Órgano Habilitado de la Universidad Complutense de Madrid. Todos los animales empleados en los experimentos provenían de la misma sala del animalario, y la mayor cantidad de camadas completas posibles (Charles River Laboratories, Italia y Francia). Para los experimentos de conjugación se emplearon ratones procedentes de Francia y para los de transmisión y colonización de Italia debido a un cambio de localización del animalario del proveedor. Antes de la entrada a la instalación animal y antes del inicio de los experimentos, se comprobó la presencia de bacterias resistentes en la microbiota intestinal de los ratones, empleando en todas las siembras medio selectivo suplementado con diferentes antibióticos (tabla 1). Los ratones que mostraron bacterias resistentes se descartaron para el uso en los experimentos.

Procedimiento	Medio	Antibiótico	Concentración
Ensayo de colonización	Klebsiella ChromoSelect Selective Agar Base, Merck KGaA, Darmstadt, Germany.	Cefotaxima	32 mg/l
Ensayo de transmisión		Colistina	5 mg/l
		Ertapenem	10 mg/l
Ensayo de conjugación	Brilliance <i>E. coli</i> / Coliform Selective Agar (Oxoid, FR)	Ácido Nalidíxico	20 mg/l
		Rifampicina	50 mg/l
		Cloranfenicol	25 mg/l

**Tabla 1. Medios selectivos y antibióticos empleados en cada modelo experimental.**

## Modelo animal para el estudio de la colonización por *Klebsiella pneumoniae* productoras de carbapenemasas

### Revisión bibliográfica y análisis de la base de datos disponible en el HULP

Se revisaron todos los artículos disponibles en PubMed (National Center for Biotechnology Information, U.S. National Library of Medicine) mediante las palabras clave “*Klebsiella*”, “OXA48” y “Mingorance”. En total se analizaron doce artículos, para obtener toda la información disponible para el desarrollo del modelo. Además, se revisó la base de datos de la unidad de microbiología del HULP hasta 2017. En esta base se registraron un total de 2122 O48EntBac de 1869 pacientes diferentes con sus historiales clínicos. Para este trabajo, se seleccionaron y clasificaron todos los aislados de O48EntBac mediante el siguiente proceso: (I) se ordenaron todos los aislados de cada paciente por orden cronológico, (II) se consideraron nuevos aislados los primeros detectados por cada paciente y por especie, (III) los aislados repetidos de la misma bacteria fueron asumidos como reaislamientos y no se tuvieron en el cálculo de nuevos casos. Posteriormente, se contabilizó el número de nuevos casos por año y por especie y se realizó la comparación entre años. Una vez realizado esto, se clasificaron en tres grupos: Kp (aisladas de un caso clínico o aisladas en los muestreos rutinarios de colonizados para el control del brote), *E. coli* y otras EntBac analizándose su evolución temporal desde 2012 a 2017.

### Preparación de los inóculos de *Klebsiella pneumoniae* productora de bla<sub>OXA48</sub>.

Para analizar la capacidad de colonización de O48PKp responsable del brote del HULP, se emplearon los dos ST más frecuentes ST11 y ST405. Para preparar el inóculo que se administró a los ratones, se seleccionó un único aislado de cada ST procedente de dos

pacientes colonizados. Ambos clones se descongelaron en placas de agar selectivas de Kp. (Klebsiella ChromoSelect Selective Agar Base, Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Para ambos, de manera independiente, una sola colonia se inoculó en un tubo de cristal con 5 ml con BHI (Brain Heart Infusion Broth, Sigma-Aldrich, España) y se incubó en la estufa en agitación. De este cultivo se pasaron 100 µl a un matraz con 250 ml de BHI fresco y se incubaron de nuevo en las mismas condiciones. Todas las incubaciones se realizaron a 37°C durante 24 horas y el medio se suplementó con 10 mg/l de Ertapenem (Sigma-Aldrich, España). El cultivo total se centrifugó a 6000 rpm durante 6 minutos, repitiendo este paso dos veces hasta que se eliminó todo el medio sobrante y se resuspendió el sedimento en 20 ml de PBS con glicerol al 20%. Luego, se dividió en alícuotas en viales de 1 ml en Eppendorf (Eppendorf, AG) y se congeló a -80°C. La concentración se determinó después de 24h descongelando un vial y sembrando diluciones en serie en placas de agar selectivo de Kp y contando el número de colonias. Este procedimiento se repitió simultáneamente a la inoculación de los ratones para el recuento de la viabilidad del inóculo.

### Métodos de detección

Para evaluar el número total de O48PKp en las heces muestreadas por ratón y por día, se sembraron 100 µl de heces homogeneizadas en los medios indicados en la tabla 1 para cada experimento. Con el fin de detectar transconjugantes, se sembró la misma cantidad de heces en agar MacConkey suplementado con 1 mg/l de Ertapenem. Las colonias fenotípicamente diferentes de Kp se analizaron para determinar la presencia de pOXA48 mediante PCR con los primers y el protocolo descrito en la bibliografía anteriormente [Dallenne *et al.*, 2010]. Además, se desarrolló una PCR específica para Kp

ST11 buscando las secuencias diferenciales del genoma secuenciado de un clon del hospital (datos sin publicar) utilizando la herramienta BLAST [Altschul *et al.*, 1990] y definiendo los primers mediante el programa “Primer3” [Untergasser *et al.*, 2012]. Los primers empleados fueron ST11LPiD-F 5'-TCATACTTGCTCTCGTGACCT-3', ST11LPiD-R 5'-CGATACGCCTAGAACACGA-3'.

### Análisis del potencial colonizador y los patrones de excreción en heces de las cepas en estudio en el modelo de O48PKp

Para estudiar el potencial de colonización de O48PKp después de una inoculación oral, 20 ratones hembra C57BL/6N de 6 semanas se alojaron individualmente y se dividieron en dos grupos. Después de una semana de aclimatación, se administraron 10<sup>9</sup> UFC de inóculo preparado a cada ratón a través de sondaje oral. Se administró ST11 al primer grupo y ST405 al segundo. De cada ratón, se recogieron 25 gránulos de heces diariamente durante 14 días, se pesaron, se suspendieron en 5 ml de PBS y se homogeneizaron durante 5 minutos en Stomacher (Seward. Ltd.). El estado general de los ratones y la ingesta de alimentos y agua se evaluaron para detectar posibles infecciones.

### Análisis del efecto de los antibióticos sobre el potencial de colonización de O48PKp ST11 y la transmisión horizontal pOXA48

Para comprender el papel de los antibióticos en la colonización y la diseminación de pOXA48 en la microbiota de ratones, se alojaron individualmente diez ratones hembra C57BL/6N de 6 semanas (Charles River Laboratories, Italia). Después de una semana de alojamiento, se administraron 10<sup>9</sup> UFC de inóculo preparado al ratón a través de sondaje oral. De cada ratón, se recogieron todas las heces diariamente desde el día 0 hasta el día 14 y en los días 17,19,22,26 y 28 después de la inoculación. Las heces se pesaron para

poder relativizar la concentración de unidades formadoras de colonias (UFC) por gramo, se suspendieron en 5 ml de PBS y se homogeneizaron durante 5 minutos en Stomacher (Seward. Ltd.). Se administró un tratamiento con Amoxicilina en el agua (25 mg/l) desde el día 17 hasta el día 22 y los biberones de agua se cambiaron cada 12 horas. La ingesta promedio de agua del ratón se estimó de acuerdo con la bibliografía en 8 ml por día [Bachmanov et al., 2002].

### Transmisión directa boca a boca de *Klebsiella pneumoniae*

#### Preparación de los inóculos de KPCPKp.

Para analizar la capacidad de transmisión de Kp se empleó un clon de ST258 (KPC-Kp), resistente a carbapenemes y colistina, proveniente de un aislado clínico de un paciente ingresado en la UCI del Hospital Universitario St. Orsola en Bolonia, Italia [Cannatelli et al., 2015]. Esta cepa bacteriana contiene la carbapenemasa *bla*<sub>KPC-3</sub> y adquirió resistencia a colistina mediante la inserción IS5-like en el gen *mgrB*. Para preparar el inóculo que se administró a los ratones, se realizó el mismo proceso descrito anteriormente sin suplementar con antibiótico.

#### Métodos de detección

Para evaluar el número total de KPCPKp en las heces muestreadas por ratón y por día, se sembraron 3 ml de heces homogeneizadas en los medios indicados en la tabla para cada experimento congelándose el contenido restante a -80°C. Tras la incubación de las placas, en aquellas que aparecían colonias compatibles con la bacteria inoculada se realizó una PCR convencional de las mismas en las condiciones que se indican en la tabla

2, además se comprobó la presencia de *bla*<sub>KPC-3</sub> descrita anteriormente [Dallenne et al., 2010].

<b>PCR mgrb</b>	<b>Inicio: 95°C – 30 s</b>	<b>35 ciclos</b>
<b>Volumen final 25 µl</b>	<b>Alineamiento: 54°C – 60 s</b>	
	<b>Elongación: 72°C – 15 s</b>	
	<b>Final: 72°C – 60 s</b>	
<b>mgrB-F</b>	TTAAGAAGGCCGTGCTATCC	0.5 µl a 50 mM
<b>mgrB-R</b>	AAGGCGTTCATTCTACCACC	0.5 µl a 50 mM
<b>H<sub>2</sub>O</b>		17,8 µl
<b>Buffer 5x HF Phusion</b>	Thermo Fisher Scientific <sup>TM</sup>	5 µl
<b>DNTPs 25mM</b>	Biotooolstm	0,5 µl
<b>Phusion DNA polimerasa</b>	Thermo Fisher Scientific <sup>TM</sup>	0.2 µl

**Tabla 2. Protocolo de PCR y primers empleados para la detección de la cepa de *Klebsiella pneumoniae* ST258 resistente a Colistina empleados en este trabajo.**

### Estructura poblacional

Para determinar la distribución de animales en el sistema de contacto, todos los ratones se introdujeron en el animalario con 4 semanas de edad y se aclimataron durante 1 semana en grupos de hasta 6 individuos del mismo sexo. Posteriormente se establecieron dos tipos de grupos de interacción con los que se realizaron 5 réplicas. El primero estaba compuesto por 6 hembras en las cubetas adyacentes y un macho en la cubeta central; el segundo estaba compuesto por 6 machos en las cubetas adyacentes y una hembra en la cubeta central. Estos grupos fueron introducidos en el sistema y el número de contactos se registró durante un periodo de 17 horas.

## Ensayos de transmisión

Para los experimentos de transmisión todos los animales fueron introducidos en el animalario con 4 semanas de edad y aclimatados durante una semana, las hembras se agruparon en cubetas de 6 en 6 y los machos se alojaron individualmente en otra cubeta adyacente. Para este experimento se realizaron 9 réplicas.

El día -1 del experimento, los ratones se distribuyeron según el esquema indicado en la tabla 3, en cada unidad de la cubeta de contacto, menos el macho que se introdujo posteriormente. El día 0, el día 2 y el día 3 se recogieron todas las heces de cada cubeta, se suspendieron en 5 ml de PBS y se homogeneizaron durante 5 minutos en Stomacher (Seward. Ltd.). El día 1 y el día 2 se administraron a los ratones la combinación antibiótica indicada en la tabla 3. El día 2 se introduce el macho en la cubeta central inoculado con  $10^9$  UFC de KPCPKp suspendidas en 0,1 ml de PBS.

Día	Ratón				
	1 -Hembra	2-Hembra	3-Hembra	4-Hembra	5-Macho
0	Clindamicina	Clindamicina	Clindamicina	No tratado	No tratado
1	Clindamicina	Clindamicina	Clindamicina	No tratado	No tratado
2	Colistina	Colistina	No tratado	No tratado	Clindamicina

**Tabla 3. Esquema de los tratamientos antibióticos administrados cada día a los animales alojados en el sistema de transmisión**

Para grabar los contactos se dispuso una cámara cenital que enfocaba a la cubeta central y las zonas de contacto con las adyacentes. Debido a que la mayor actividad se observaba durante la noche, se instaló una luz roja compatible para trabajar en



animalarios nocturnos sin alterar los ritmos circadianos de los ratones. El tiempo de grabación de los experimentos fue de 17 h, excepto el último que se amplió a 24 h. El número de contactos, la hora, y la duración de los mismos fueron registrados manualmente.

### Ensayo de conjugación *in vivo*

#### Preparación de los inóculos de *E. coli*.

Para analizar la capacidad de inhibición de la conjugación del ácido 2HDA *in vivo* se emplearon dos cepas de laboratorio de *E. coli* MDS52. La donadora resistente intrínsecamente a ácido Nalidíxico y portadora del plásmido pOXA38 que confiere resistencia a Cloranfenicol. Para preparar el inóculo que se administró a los ratones, se realizó el mismo proceso descrito anteriormente suplementando el medio de la donadora con Cloranfenicol y ácido Nalidíxico y el de la receptora con Rifampicina a las concentraciones indicadas en la tabla 2.

#### Métodos de detección

Para evaluar el número total de transconjugantes en heces y la frecuencia de conjugación de pOXA38 en el modelo animal, se sembraron por placa 100 µl de cada muestra por triplicado en medio selectivo con los antibióticos correspondientes para contar el número de donadoras, receptoras y debido al bajo número de transconjugantes por experimento una vez realizadas las placas de donadoras y receptoras se sembró toda la muestra restante para incrementar la capacidad de detección. Para las colonias transconjugantes, la presencia del plásmido se confirmó mediante PCR.

En los experimentos se utilizaron 32 ratones C57BL6 machos de cuatro semanas de edad. Los ratones se alojaron en grupos de cinco durante una semana para la aclimatación. Posteriormente, el día antes de la inoculación, los ratones fueron alojados individualmente. Se inocularon ratones mediante sonda oral con la misma concentración de bacterias donadoras y receptoras ( $10^9$  UFC) suspendidas en 100  $\mu$ l de PBS y suplementadas con 100  $\mu$ g de 2HDA o ácido linoleico en el caso de cada grupo experimental. Después de 24 horas, se recogieron y pesaron todas las heces. Estas se suspendieron en 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (Fisher Scientific, NJ) y se homogeneizaron durante 5 minutos en Stomacher (Seward. Ltd.).

#### Análisis de datos

En los experimentos de colonización se realizó un análisis descriptivo de los resultados por lo que no se incluyeron pruebas estadísticas. En los experimentos de transmisión se realizó un análisis de componentes principales mediante el programa SAS Analytics y el estadístico PROC FACTOR (SAS Institute Inc.). Para el ensayo de inhibición de la conjugación, la frecuencia de conjugación se calculó dividiendo el número de transconjugantes entre el número de receptores aislados, para analizar las diferencias se realizó un test de análisis de la varianza (ANOVA) y las pruebas Tukey *post hoc* asociada mediante el mismo programa y el estadístico PROC ANOVA – DUNNETT.



# Resultados

**“You shall know the truth and the truth shall make you mad.”**

**Aldous Huxley**

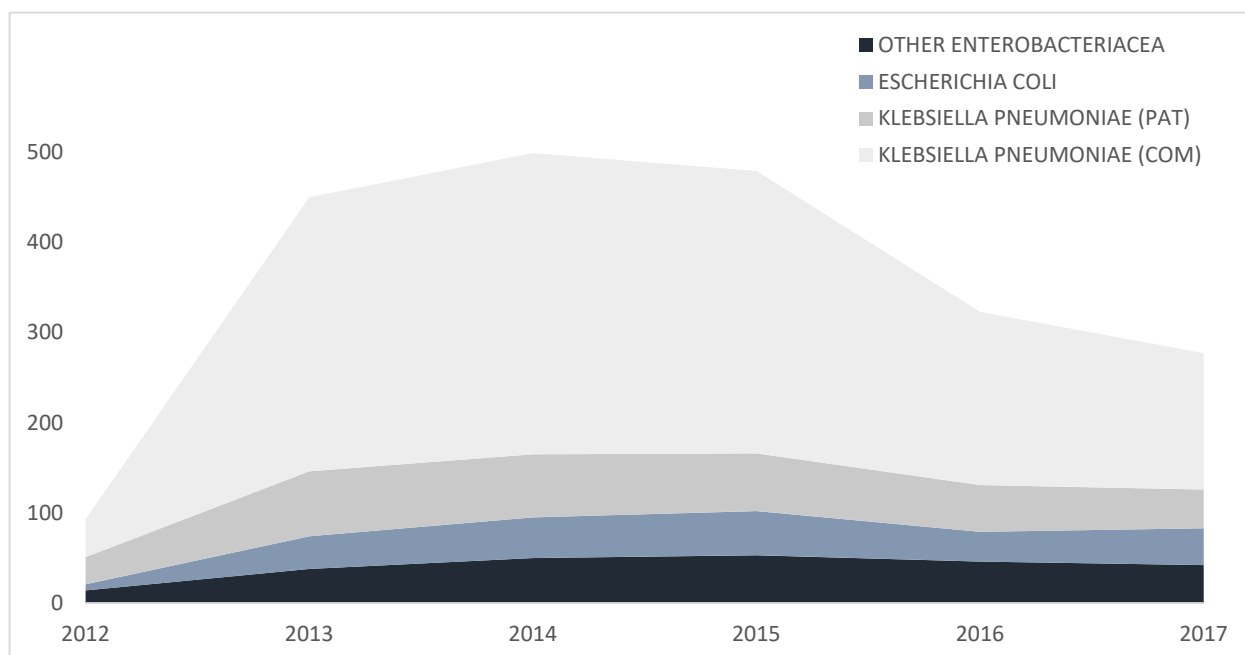


## Descripción del brote epidémico de CP-Kp portadoras de *bla*<sub>OXA48</sub>

EL HULP es uno de los hospitales más grandes de Madrid en el que son atendidos casi 50.000 pacientes cada año. Durante los últimos 9 años, el HULP ha estado luchando para controlar un brote de EntBac productoras de carbapenemasas que se ha diseminado por diferentes áreas del hospital. Desde los primeros registros de O48PKp en el HULP en 2010, el número de nuevos pacientes colonizados o infectados por esta bacteria aumentó de manera progresiva hasta 2014 cuando se implementaron varias medidas de control para contener el brote nosocomial [Pérez-Blanco *et al.*, 2018]. En 2014, el número de casos de O48PKp comenzó a disminuir. Sin embargo, los casos de *E. coli* (O48PEc) y otras enterobacterias (O48PEntBac) productoras de OXA48 continuaron creciendo (Figura 2).

El último conjunto de datos incluido en este trabajo que abarca de 2010 a 2017 indica que la cantidad de nuevos aislamientos de O48PKp de pacientes colonizados disminuyó, un 38% en 2016 y un 21% en 2017 en comparación con el año anterior (Figura 2). Además, los aislamientos clínicos también han disminuido, pero en menor medida, en un 19% en 2016 y en un 17% en 2017. En el caso de O48PEc, el número de nuevos aislamientos disminuyó en 2016, pero contrariamente a la tendencia general, el número de casos aumentó en un 24% en 2017. Para el grupo de otras O48PEntBac, también hubo una reducción del 13% en el número de casos en 2016, pero los niveles se mantuvieron en 2017 (Figura 2). Estos datos resaltan la importancia de O48PEc y otros O48PEN en la

diseminación de pOXA48 y la complejidad del brote. Estos aislados han alcanzado niveles similares a los que presentan las O48PKp que produjeron cuadro clínico.

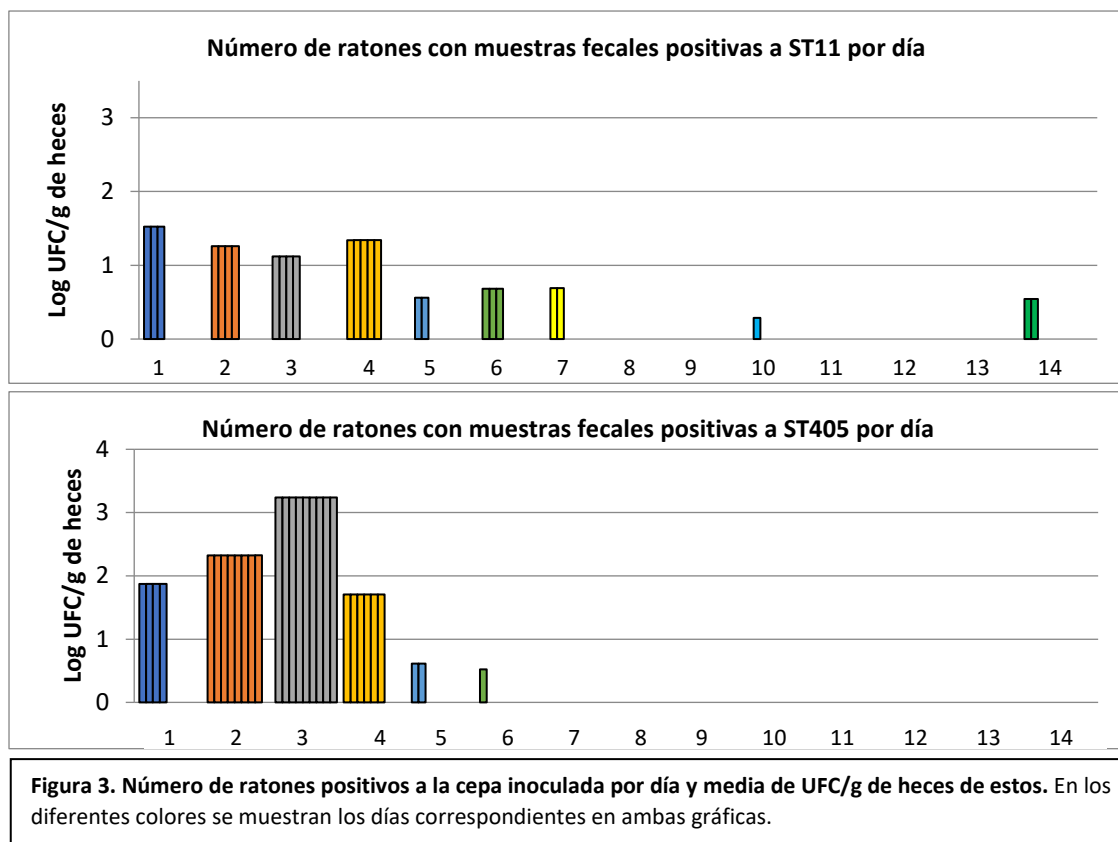


**Figura 2. Número de nuevos aislados de enterobacterias productoras de *bla*<sub>OXA48</sub> al año en Hospital Universitario de La Paz.** Los aislados de *Klebsiella pneumoniae* están representados en gris, el gris claro muestra los comensales aislados en los muestreos y el gris oscuro los aislados clínicos. En azul, se representan otras enterobacterias, en claro se muestran los aislados de *E. coli* y en oscuro se agrupan el resto de enterobacterias diferentes de las mencionadas.

### Potencial de colonización y patrón de excreción de los dos clones de O48PKp (ST11 y ST405)

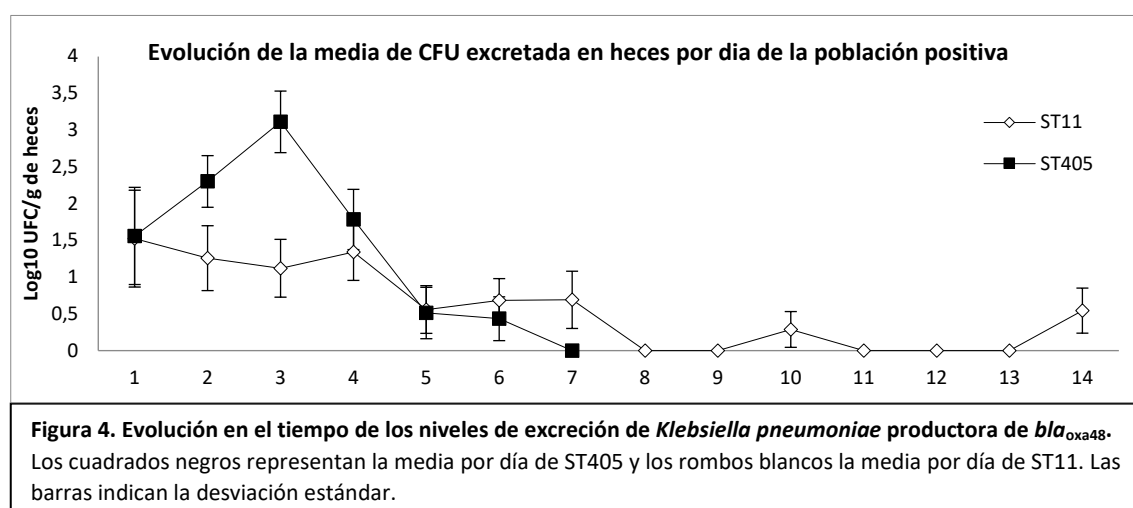
En el año 2010 se detectó por primera vez un aislado correspondiente al ST405, que posteriormente se extendió por diversas áreas del hospital. A los dos años, se detectó por primera vez ST11 en el hospital y de forma más rápida este se extendió por el hospital, convirtiéndose ambos en los dos clones mayoritarios [Lopez-Camacho et al., 2018]. Es importante resaltar que el ST11 ha desplazado a ST405 del hospital siendo aislado con mayor frecuencia. Aunque se realizaron estudios comparativos *in silico* del genoma de ambos ST no se detectaron diferencias significativas que pudieran explicar el éxito de ST11 sobre ST405 (resultados sin publicar). Para analizar diferencias fenotípicas en la capacidad de colonización, se inoculó por vía oral a cada grupo de

ratones uno de los dos ST más prevalentes presentes en HULP, ST11 y ST405. La concentración de inóculo fue de  $10^9$  UFC. No se observaron síntomas clínicos de infección, como diarrea, pérdida de peso o inapetencia, en los ratones durante el experimento. El número de individuos que presentaron colonización fecal por día varía según la cepa, en concreto, ST405 se detectó durante el periodo de seguimiento en un mayor número de ratones colonizados por día en comparación con ST11 (Figura 3). En importante destacar que el ST405 se observó en un mayor número de animales durante los primeros 4 días, alcanzándose la mayor diferencia el día 3 donde se detectó el doble de individuos positivos de este ST. Por ejemplo, ST405 se detectó en ocho y nueve individuos en los días 2 y 3 respectivamente. Por el contrario, ST11 nunca se detectó en más de cinco ratones por día (50% de la unidad experimental). Sin embargo, los días 6 y 7 ST11 fue detectado en 2 animales más que ST405.





Si se analizan los niveles medios de excreción el primer día, después de la administración del inóculo los niveles fueron similares en ambas cepas. Sin embargo, en el segundo día y tercer día, se detectó ST405 a una concentración dos y tres veces mayor que la del ST11 respectivamente. Después del pico alcanzado el día 3 por ST405, los niveles disminuyeron más rápido que los de ST11 y no se detectó pasado el día 6. Por el contrario, los niveles de eliminación de ST11 se mantuvieron similares durante los primeros 4 días, luego disminuyeron en un 50% el día 5 y se mantuvieron de nuevo hasta el día 7. Finalmente, todas las muestras fueron negativas hasta el día 10 y el día 14 en que se detectó ST11 puntualmente en 1 y 2 ratones respectivamente (Figura 4).



Según el modelo, ambos ST parecen presentar diferentes tendencias de excreción intestinal, pero las diferencias individuales dentro del grupo impiden sacar conclusiones de manera significativa cuando se analizan estadísticamente. Observándose estas medias, las principales diferencias entre ambos patrones serían que el ST405 muestra un aumento abrupto en los niveles de excreción durante los primeros tres días del experimento, mientras que el ST11 se excretó dos días más y se detectó dos veces pasados 10 días después de la administración del inóculo.

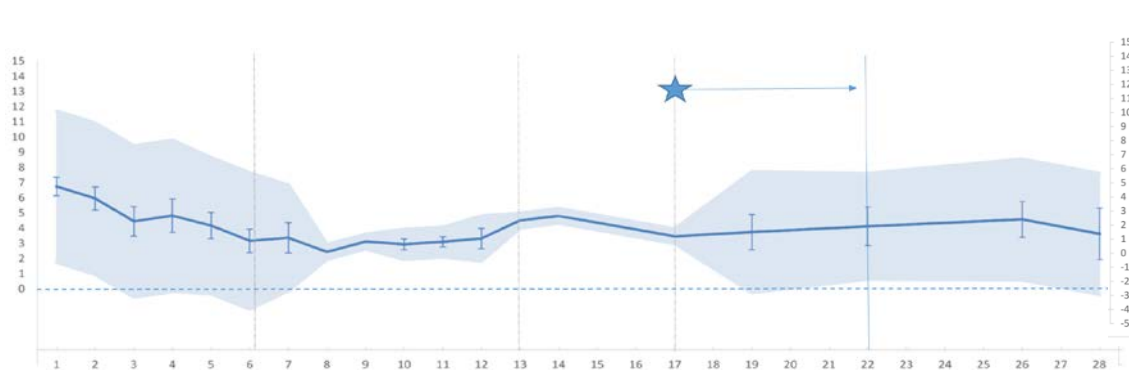
## Dinámica de colonización de O48PKp en un modelo animal: Efecto de la amoxicilina sobre la persistencia de pOXA48 en la microbiota intestinal

Una vez comprobado que sólo el ST11 era capaz de colonizar en el modelo de ratón por más de 14 días, se procedió a definir la capacidad de persistencia de este a más largo plazo en un modelo de ratón y el efecto de uno de los antibióticos más utilizados, la Amoxicilina, en la colonización. Para ello, se inocularon por vía oral los ratones y todas las heces se recolectaron de las jaulas individuales. En este modelo a diferencia del anterior, se recogieron todas las heces de la cubeta a diario y se amplió la duración del periodo de seguimiento. Además, se analizó la presencia de transconjugantes.

En este experimento, el ST11 de O48PKp se detectó en el 100% de los ratones durante 5 días, en el 90% durante 6 días y en el 70% durante 7 días. Del día 8 al 17, solo un ratón permaneció colonizado y otros 2 mostraron un resultado positivo un solo día los días 10, 11 o 12. Un día después de la administración del tratamiento antibiótico, se detectó O48PKp en el 70% de los ratones, detectándose al menos un resultado positivo en todos los ratones hasta el final de los experimentos.

La población presentó una dinámica de colonización decreciente desde el día 1 hasta el día 8 y las diferencias individuales dentro del grupo fueron menores que las observadas después de la administración del tratamiento de Amoxicilina. Desde el día 8 hasta el día 17, solo un ratón permaneció colonizado. Los otros dos individuos positivos (días 10, 11 y 12) mostraron niveles de colonización cercanos a los límites de detección. Un día después del tratamiento antimicrobiano, el 80% de los ratones recuperaron el estado de colonizado y los niveles de excreción fueron homogéneos dentro del grupo, excepto para el ratón que estaba altamente colonizado entre los días 8 y 17. Después de 48 horas del tratamiento antimicrobiano, las diferencias individuales se incrementaron y no se pudo definir un patrón claro de evolución. Incluso 6 días después del tratamiento, el 70% de los ratones permanecieron colonizados y las

diferencias individuales disminuyeron. Dos ratones mostraron niveles de colonización más altos que los otros 8 que presentaron niveles similares a los observados en el día 6 del experimento.



**Figura 5. Evolución del número de ratones positivos y los niveles de excreción en heces de *Klebsiella pneumoniae* productora de *bla*<sub>OXA48</sub> inoculada por vía oral y el efecto de la administración de Amoxicilina sobre esta:** La línea azul indica los niveles medios de excreción de la población positiva, el sombreado azul indica el número total de ratones positivos, la estrella indica el día de comienzo del tratamiento y la flecha la duración del mismo. Las líneas verticales indican el día de cambio de cubeta. Las barras verticales indican los errores estándar. El gráfico muestra los resultados obtenidos mediante la siembra en placa.

### Diseminación de *bla*<sub>OXA48</sub> a la microbiota intestinal del ratón

Los transconjugantes aislados de pacientes con neumonía en el hospital mostraron niveles de resistencia más bajos en comparación con los aislados de O48PKp (datos no publicados). Por lo tanto, para monitorear la posible diseminación *in vivo* del plásmido pOXA48 a la microbiota de ratón, se sembraron a diario muestras fecales en placas de agar MacConkey suplementado con 1 mg/l de Ertapenem. A esta concentración, no se observó crecimiento en las muestras de control tomadas antes de comenzar el experimento. Todas las colonias que eran fenotípicamente diferentes en comparación con las de O48PKp se analizaron para detectar la presencia de *bla*<sub>OXA48</sub>. Se seleccionaron un total de 104 colonias candidatas y los falsos positivos se eliminaron mediante PCR específica para el plásmido. Los donantes también fueron detectados y descartados mediante la PCR específica de ST11. Solo en los días 26 y 28, dos a cuatro días después del tratamiento con antibióticos, cuatro aislamientos independientes de dos ratones diferentes fueron positivos para *bla*<sub>OXA48</sub> y negativos para las PCR específicas de ST11, lo

que indica una transmisión horizontal exitosa del plásmido que codifica para la carbapenemasa a otras bacterias de la microbiota de los ratones. Esos aislamientos fueron identificados por MALDI-TOF como *Escherichia coli* y se determinó su perfil de resistencia a los antibióticos. Los cuatro aislados mostraron el mismo perfil de resistencia a los antibióticos que se asocia con la presencia de *bla*<sub>OXA48</sub> aislada de pacientes colonizados en el hospital (Tabla 4).

	LPUHKB (ST11)	Transconjugantes			
Antibiótico		4d26E	4d26G	5d26A	4d28A
Amoxicilina/Ác. Clavulánico	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8	>16/8
Cefoxitin	16	<=8	<=8	<=8	<=8
Ceftazidime	>32	<=1	<=1	<=1	<=1
Cefepime	>16	<=1	<=1	<=1	<=1
Imipenem	2	<=1	<=1	<=1	<=1
Ertapenem	>1	1	1	1	1
Gentamicina	<=2	<=2	<=2	<=2	<=2
Tobramycina	<=2	<=2	<=2	<=2	<=2
Amikacina	<=8	<=8	<=8	<=8	<=8
Nitrofurantoine	>64	<=64	<=64	<=64	<=64
Ciprofloxacina	>2	<=0,5	<=0,5	<=0,5	<=0,5

Tabla 4. Perfil de resistencia de la cepa inoculada y los transconjugantes aislados.

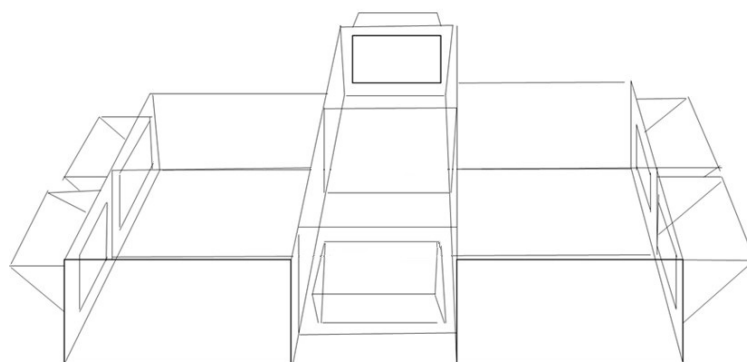
## Sistema de alojamiento de animales de laboratorio para el estudio de la transmisión de infecciones por interacciones “boca a boca”

Con el objetivo de investigar la transmisión de bacterias resistentes a antibióticos por contacto directo, se desarrolló un sistema de alojamiento “*ad hoc*” que permitiera superar las limitaciones presentadas por los sistemas actuales. Por tanto, la invención presentada en este trabajo se encuadra en el sector de los alojamientos para animales de laboratorio. En concreto, en el sector de los alojamientos empleados en el estudio de las interacciones entre roedores, específicamente las interacciones “boca a boca”, y la relación de dichas interacciones con la transmisión de agentes infecciosos.

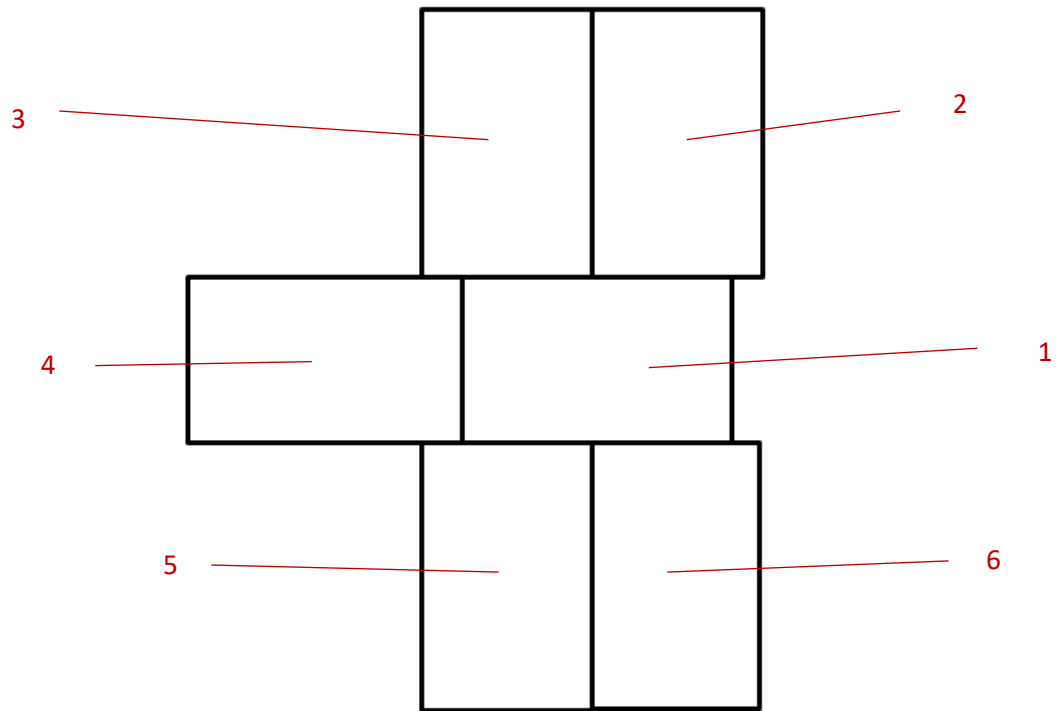
### Diseño y construcción del sistema de alojamiento

Para este trabajo, se elaboró un sistema de alojamiento que cumpliera los requisitos legales sobre alojamiento para ratones (boceto 1). Este está formado por 6 cubetas de metacrilato de 20 cm de ancho y 28 cm de largo (boceto 2): una cubeta central (1) y cinco cubetas adyacentes (2-6) las cuales comparten parte de las paredes con la central. Las paredes compartidas con la cubeta central presentan dos agujeros en su parte media de 0,5 cm de diámetro que permiten el contacto de los ratones alojados en las cubetas adyacentes con el ratón alojado en la cubeta central (boceto 3). Estas piezas constituyen en el sistema las paredes laterales largas de la cubeta central y una de las paredes cortas de las cubetas 2,3,5 y 6. Para dividir las cubetas 1 y 4 se ha añadido la pared corta central donde se ha incluido un orificio de las mismas características que los indicados anteriormente, este orificio ocupa la posición central en la pared (boceto 5). Cada cubeta dispone, en la pared opuesta al orificio de contacto, es decir, en la pared corta externa, una ventana de 16 cm de ancho por 8 cm de alto y situada a dos centímetros

del borde superior de esta pared (boceto 4). En esta ventana se superpone una rejilla que permite administrar alimento y bebida. La rejilla debe presentar espacios en el trenzado de 0,5 cm. La bandeja externa está compuesta por dos piezas laterales triangulares de 8 centímetros de cateto y una rectangular de 16 cm por 11,31 cm que forma la base de la bandeja, y que luego se adhieren a cada cubeta, por la parte externa de las paredes cortas enmarcando cada ventana (boceto 7). El sistema de alojamiento tiene una altura de 14 cm y está cubierto por una tapa de cristal que permite la observación de la actividad de los animales alojados y por tanto los contactos que suceden en el interior del sistema de alojamiento sin la problemática del oscurecimiento o rallado que sufren en ocasiones las tapas de metacrilato, frecuentemente utilizadas en los alojamientos de animales de laboratorio (boceto 8). Para complementar la descripción que se está realizando y con objeto de ayudar a una mejor comprensión de las características de la invención, se acompaña como parte integrante de dicha descripción, un juego de dibujos en donde con carácter ilustrativo y no limitativo, se ha representado lo siguiente:



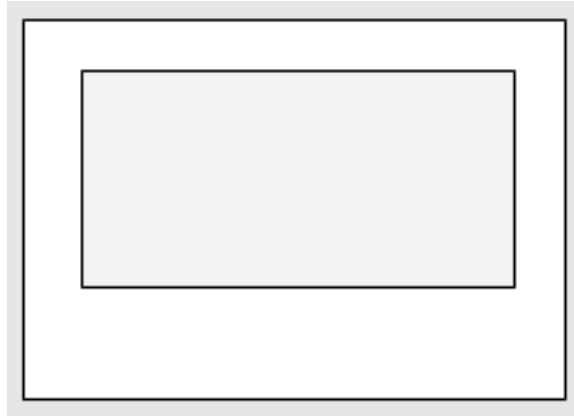
**Boceto 1.- Esquema del alojamiento, donde se pueden identificar todas las cubetas y las bandejas laterales**



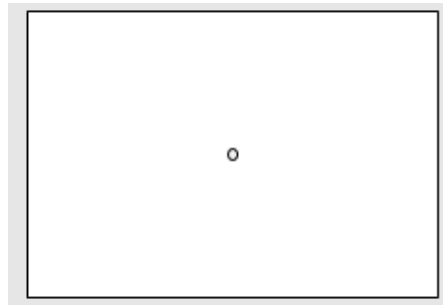
**Boceto 2.- Imagen de la base que representa la distribución de las diferentes cubetas** indicadas con la siguiente numeración: el 1 la cubeta central y del 2 al 6 las cubetas adyacentes



**Boceto 3.- Esquema de una pared larga** que abarca los laterales de la cubeta central (1) y una cubeta adyacente (4). Además de las paredes de contacto de las cubetas (2,3,5,6)



**Boceto 4.- Esquema de una pared lateral corta** donde se adhieren la rejilla y la bandeja externa de alimento (zona sombreada en gris)



**Boceto 5.- Esquema de la pared corta que divide la cubeta central (1) de la cubeta adyacente (4).**

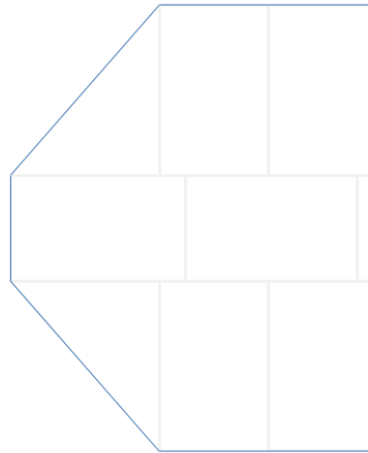


**Boceto 6.- Esquema de la pared larga de las cubetas laterales adyacentes.**





**Boceto 7.- Esquema de las piezas de las bandejas de alimentación y agua,** por cada bandeja (rectángulo) hay que incluir dos paredes triangulares. Esto forma una estructura que se adhiere externamente al rectángulo enrejillado presentado en el boceto 6.



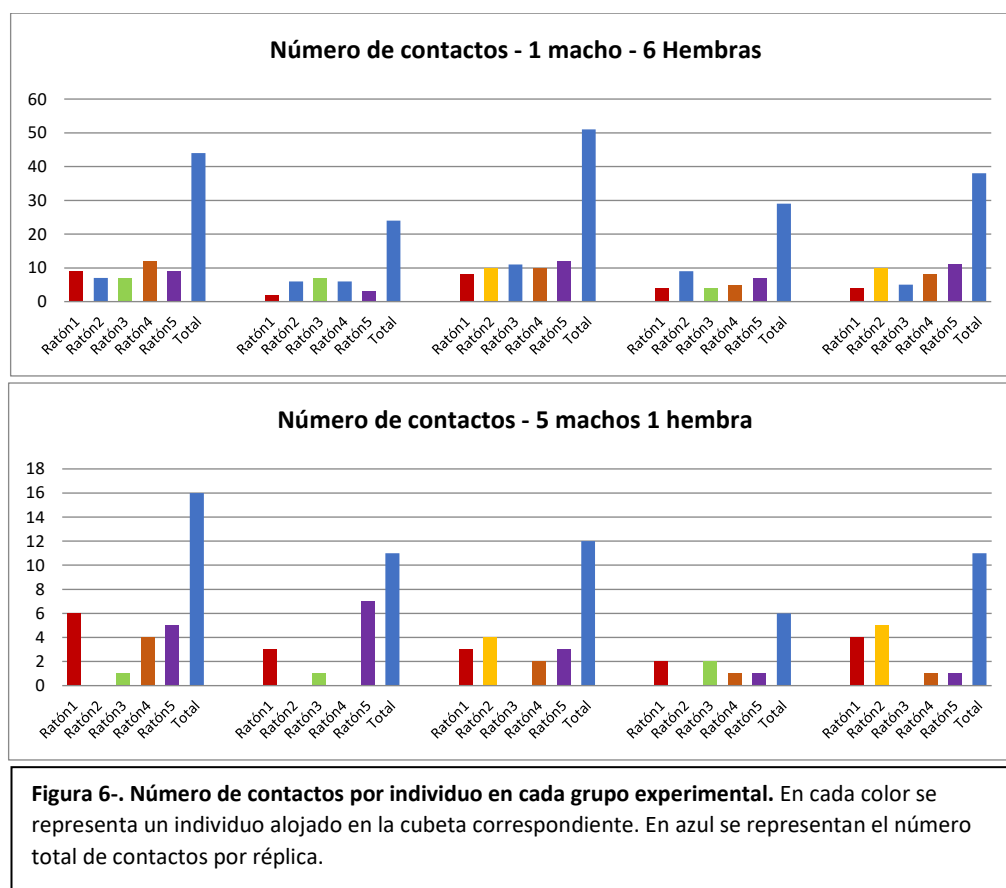
**Boceto 8.- Esquema de la vista cenital que representa la tapa de cristal (azul) sobre las cubetas**

### Definición del modelo experimental y los grupos de contacto

Una vez definido y diseñado el sistema de alojamiento que permite interactuar a los ratones, se procedió a definir la estructura social que presentara el mayor número de contactos y la mayor homogeneidad entre los diferentes individuos. Para ello se plantearon dos estructuras sociales de interacción básica basadas en el instinto reproductivo, situando en la primera estructura un ratón macho en la cubeta central y

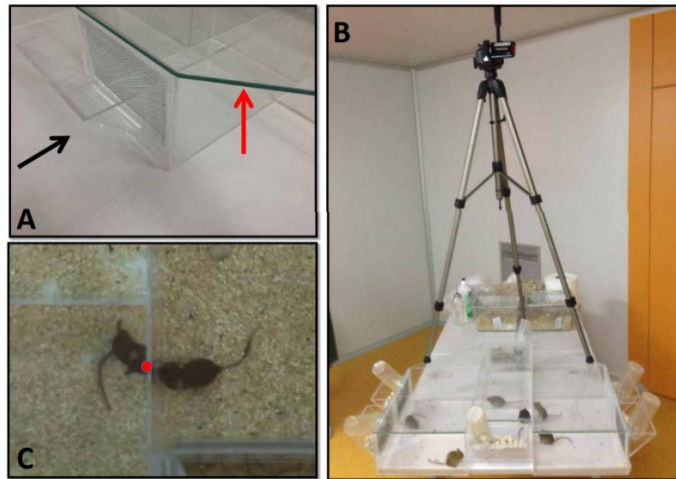
una hembra en cada una de las cubetas adyacentes, mientras que en la segunda, se situó en la cubeta central una hembra y un macho en cada una de las cubetas adyacentes.

Como se puede observar en las siguientes gráficas (figura 6) existen diferencias entre ambos grupos en estudio. El número de contactos totales en todas las réplicas realizadas con 1 macho y 6 hembras superó los 20, incluso en una de ellas superó los 50 contactos. También es importante destacar que en todas las réplicas de este grupo hubo al menos un contacto entre el ratón de la cubeta central y las ratonas de las adyacentes. En este grupo, la media de contactos por réplica fue de 37,2 y la media de contactos por ratón fue de 7,44. Por el contrario en el grupo de 1 hembra y 5 machos, en todas las réplicas el número de contactos nunca superó los 20, al menos un ratón adyacente no tuvo contacto con el ratón central y en al menos 6 ocasiones solo hubo un contacto entre la ratona de la cubeta central y los ratones de las cubetas adyacentes. En este grupo, la media de contactos fue de 2,24 por ratón y la media del grupo experimental de 11,2 contactos totales. Por todo esto, se decidió emplear en los experimentos de transmisión el grupo formado por un ratón en la cubeta central y 5 ratonas en las cubetas adyacentes.



### Transmisión por contacto directo boca a boca de *Klebsiella pneumoniae* portadora de *bla*<sub>KPC</sub>

Hasta el momento en este trabajo se han empleado cepas de Kp portadoras del plásmido conjugativo pOXA48 que codifica para el gen de la betalactamasa OXA48. Cuando se realizó un primer experimento piloto con el clon ST11 del HULP y se empleó Amoxicilina para facilitar la transmisión bacteriana se observó como el plásmido se diseminaba entre la microbiota del ratón donador. Además, mediante este tratamiento se seleccionó un clon de *Klebsiella oxytoca*, resistente de manera intrínseca a este antibiótico,



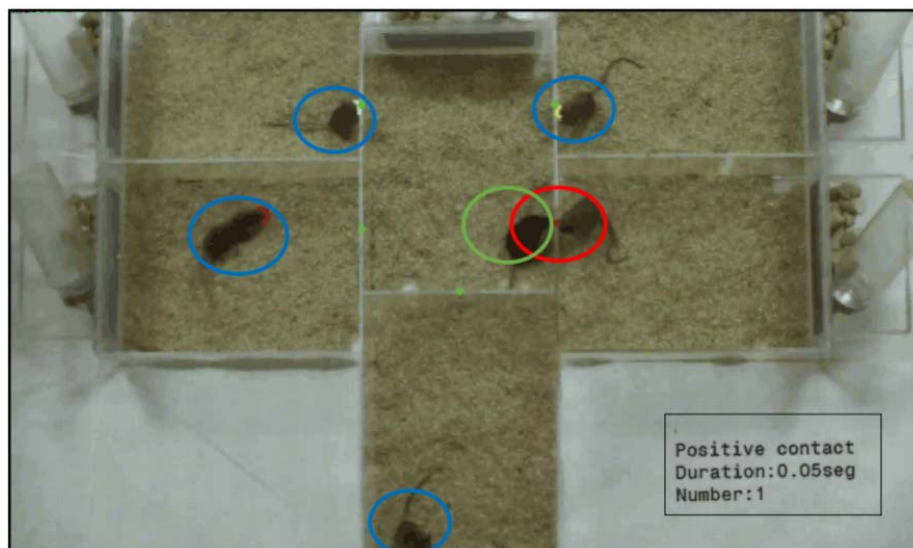
**Imagen 3. Imágenes del sistema de alojamiento y el contacto de dos ratones.** A) Imagen detallada de la tapa de cristal indicada por la flecha roja y el sistema de alimentación indicado por la flecha negra. B) imagen del sistema en su conjunto con la cámara cenital. C) imagen de un contacto, en rojo se representa el orificio de contacto

procedente de la microbiota del ratón que no había sido detectado en los controles rutinarios previos al experimento. El uso de un antibiótico betalactámico y la resistencia intrínseca de Kp. supuso un incremento en la complejidad del modelo. Por todo esto, se decidió emplear una cepa nosocomial epidémica como ST258 portadora de la betalactamasa KPC que se encuentra codificada en un plásmido no conjugativo, además esta cepa es resistente a colistina debido a una mutación cromosómica en el gen *mgrB* lo que incrementaba las posibilidades de selección.

Una vez determinado el grupo de interacción y la cepa a transmitir se realizó de nuevo un procedimiento piloto sin seguimiento por video para detectar posibles nuevos problemas. En este experimento se observó transmisión hacia uno de las ratonas por primera vez y no se detectaron problemas (imagen 3).

Posteriormente, se realizaron 9 réplicas del modelo experimental en las que mediante el sistema de grabación se pudo realizar el seguimiento de la actividad de los ratones. En estas réplicas se anotó el número de contactos por hora, el tiempo de contacto y se

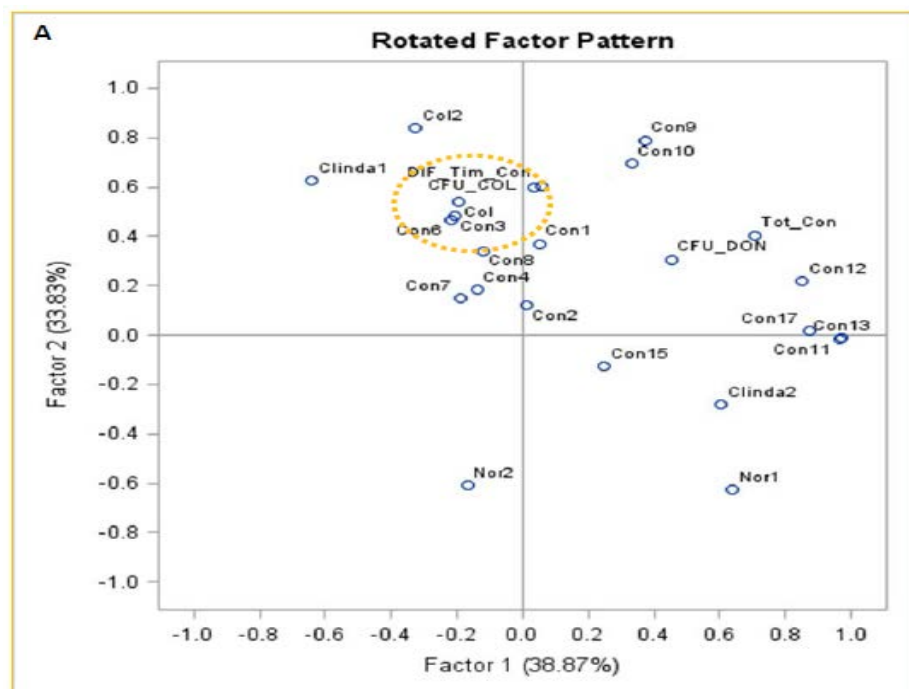
calculó la duración media de los mismos (imagen 4). Otros factores como la ingesta de agua, alimento o el acicalamiento no se registraron. El número medio de contactos por réplica fue de 18,18, el tiempo medio total de contacto entre el ratón donador y cada uno de los receptores fue de 29,77 segundos, lo que resulta en una duración media de cada contacto de 1,38 segundos. La hora en la que más contactos se producen en las réplicas que se grabaron hasta la hora 17, es la 15 con una media de 1,86 contactos. En la réplica que se grabó hasta las 24 horas, en la hora 19 se observaron 6,2 contactos.



**Imagen 4. Fotograma extraído del vídeo de una de las réplicas en la que se muestra un contacto.** El círculo azul rodea las ratonas receptoras que no están en contacto con el donador. En verde se rodea al macho donador y en rojo se rodea a la hembra en contacto. Los puntos verdes sobre la cubeta central indican los agujeros libres. El punto rojo representa la posición del agujero por donde se está produciendo el contacto. En el cuadrado se identifica la duración y el número de contacto.

De los 45 ratones en riesgo de adquirir CPKp por transmisión directa boca a boca, solo 6 ratones resultaron positivos después del periodo de contacto, esto representa un 13% de la población en riesgo. De los 6 ratones positivos 4 habían recibido un tratamiento de Clindamicina y seguidamente un tratamiento de Colistina, mientras que 1 recibió solo un tratamiento de Clindamicina y el último no recibió ningún tratamiento. Ninguna ratona que no tuvo contacto con el donador resultó colonizada.

Si se analizan ambos grupos, a pesar de la variabilidad, se observan diferencias entre ellos. Hay que tener en cuenta que los grupos comparados son muy diferentes en cuanto al tamaño de muestra, que no se analizaron interacciones entre las posibles variables y que sólo en la última réplica se realizó el seguimiento hasta la hora 24. A pesar de esto, es importante destacar que la duración de los contactos, el número y los contactos ocurridos durante la primera hora y a partir de la hora 10 tienen una mayor influencia en la transmisión. Además, el tratamiento con Colistina parece clave en la transmisión de esta bacteria (figura 7).

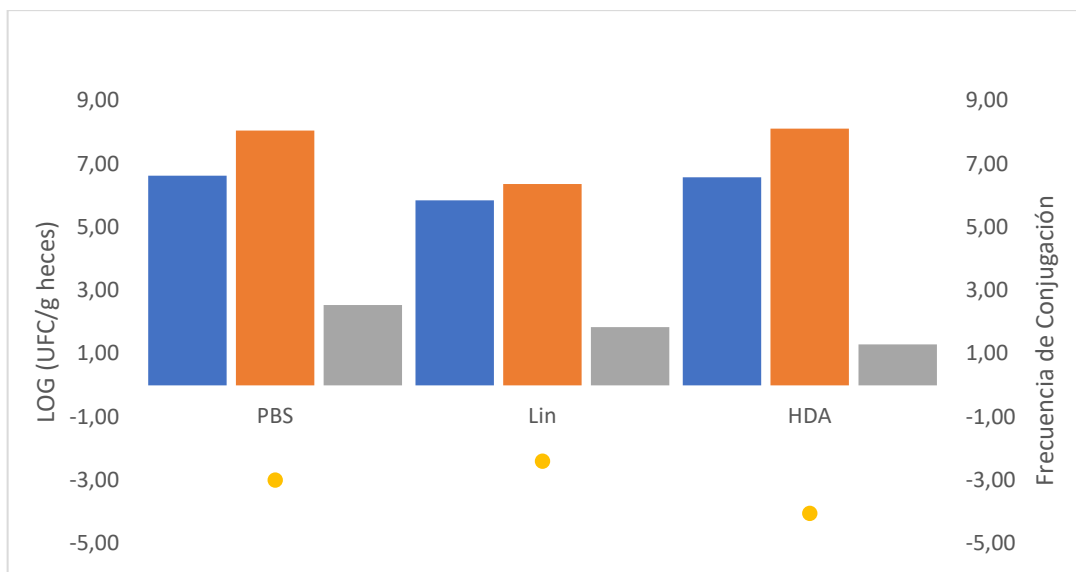


**Figura 7. Representación de los dos factores predominantes del análisis de componentes principales.** Este análisis fue realizado sobre las réplicas que se grabaron 17 horas para reducir la variabilidad. Los puntos azules indican los factores analizados. En amarillo se rodean aquellos más cercanos al factor "Col" y "CFU\_COL" que representa la colonización positiva y el número de bacterias excretadas por el receptor. Los puntos con la palabra "con" seguida de un número indican la hora de contacto. "CFU\_DON" los niveles de bacterias excretados el día 3 por el donador. "Clinda", "Col" y "Nor" seguido de un número indican tratado con clindamicina, colistina o nada en primer o segundo lugar.

## Modelo in vivo para el desarrollo de moléculas inhibidoras de la conjugación

Para analizar si el 2HDA presentaba el mismo potencial de inhibición de la conjugación *in vivo* que en los ensayos en placa, se desarrolló un modelo murino. Para estandarizar el procedimiento y debido a la baja disponibilidad del compuesto, se realizó un experimento piloto con un ácido graso polinsaturado con alta similitud estructural que nos permitiera poner a punto la técnica de preparación del inóculo y administración, para ello se seleccionó el ácido linoleico. Una vez puesta a punto la técnica se comprobó la eficacia del compuesto como inhibidor de la conjugación.

Se realizaron 15 réplicas con PBS, 10 réplicas con ácido linoleico y 12 réplicas con HDA. Se detectaron transconjugantes en 9 réplicas con PBS (60%), en 5 réplicas con ácido linoleico (50%) y 10 réplicas con 2HDA (83%). Los niveles medios de células donadoras y receptoras recuperados a las 24 horas tras la inoculación fueron similares en los experimentos realizados con PBS y 2HDA, mientras que para los experimentos con ácido linoleico los niveles de células donadoras y receptoras fueron aproximadamente 10 y 100 veces menores respectivamente. Por otro lado, los niveles de células transconjugantes fueron 10 veces mayores en las réplicas realizadas con PBS que en las otras réplicas. Cuando se analiza la frecuencia de conjugación calculada para los experimentos con PBS fue de  $9,89 \times 10^{-4}$ , de  $3,96 \times 10^{-3}$  en los animales inoculados con ácido linoleico y de  $8,74 \times 10^{-5}$  en los animales inoculados con 2HDA (figura 8).



**Figura 8. Número de UFC por gramo de heces de donadoras, receptoras, transconjugantes y frecuencia media de conjugación.** En azul se representan las donadoras, en naranja las receptoras y en gris las transconjugantes. Los puntos amarillos muestran el valor de la frecuencia de conjugación media de cada grupo.

Cabe destacar que, aunque se aisló un mayor número de transconjugantes en el grupo sin tratar que en el grupo tratado con ácido linoleico la frecuencia de conjugación resultante es mayor en el grupo tratado con ácido linoleico ya que se aislaron un menor número de donadoras. En el grupo PBS existe una correlación directa entre el número de bacterias donadoras y el número de transconjugantes (coef. de corr. 0,996), sin embargo, en el grupo tratado con LIN y en el grupo HDA no existe correlación entre estos indicando el efecto de ambos compuestos sobre la frecuencia de conjugación y por tanto el número de transconjugantes.

Si se analizan los resultados obtenidos en las pruebas in vitro y en las pruebas realizadas en modelos animales se observa una disminución significativa de la frecuencia de conjugación en todos los casos. No se observaron signos clínicos asociados a toxicidad en ninguno de los ratones en estudio a las dosis empleadas.





# Discusión

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

JOSÉ ORTEGA Y GASSET



En este trabajo se describen tres modelos animales que permiten comprender mejor la ecología de Kp, investigándose su capacidad de colonización, transmisión y cómo afecta el uso de antibióticos a estos procesos. Además, se comprobó la eficacia del 2HDA como inhibidor de la conjugación *in vivo*, una alternativa que permitirá avanzar en el control de la diseminación de plásmidos portadores de determinantes de resistencia. Los modelos desarrollados en el trabajo buscan incrementar los conocimientos disponibles y servir de base para avanzar en el control de brotes nosocomiales y el control de la diseminación de genes de resistencia.

Históricamente, dentro de las limitaciones translacionales de los modelos animales, estos han ayudado de manera relevante al avance de ciencia y la mejora de la salud de los hombres y los animales. En esta discusión se analizarán los resultados obtenidos y su posible impacto sobre la lucha contra la resistencia a antibióticos. Como se indica en la introducción de este trabajo, después de la aceptación de la teoría de los gérmenes, los modelos de transmisión de enfermedades resultaron claves para el avance en la comprensión y el control de los microorganismos, así como el desarrollo de vacunas y tratamientos.

La transmisión de bacterias ha sido tradicionalmente controlada mediante medidas básicas de higiene como el lavado de manos, la limpieza y la desinfección, además del aislamiento de individuos enfermos puesto que el contacto directo con estos y sus fómites relacionados incrementa el riesgo de transmisión de enfermedades. Más adelante, los modelos animales colaboraron en el desarrollo de vacunas y antitoxinas siendo fundamentales para la prevención, erradicación y tratamiento de muchos agentes patógenos.

La transmisión de una bacteria es el paso previo e indispensable para el potencial desarrollo de una colonización e infección de un nuevo individuo por parte de esta [Pouriki *et al.*, 2018]. En la actualidad, este problema se agrava cuando la bacteria es resistente a antibióticos y la enfermedad que causa puede carecer de tratamiento. La diseminación de bacterias resistentes a antibióticos y dispersión de determinantes de resistencia es una de las grandes amenazas para la Salud Única.

Por otro lado, en los últimos años se ha observado como ciertas bacterias están evolucionando para adaptarse a los ambientes hospitalarios y transmitirse en estos con mayor facilidad [Kumar *et al.*, 2019]. Este fenómeno es más relevante en ambientes hospitalarios donde se encuentran pacientes en riesgo, como inmunodeprimidos, ancianos y niños. Por todo esto, para frenar la expansión de esta amenaza, es necesario el desarrollo de los modelos animales que permitan comprender las ventajas fenotípicas de clones singulares para transmitirse y colonizar nuevos individuos.

En esta tesis se han desarrollado 4 modelos animales diferentes que pretenden arrojar luz ante problemas observados en ambientes hospitalarios reales. Para todos ellos se emplearon ratones de la línea coisogénica C57BL6, una cepa frecuentemente empleada en este tipo de modelos por su resistencia a la infección [Adam *et al.*, 2018; Czuprynski *et al.*, 2003]. Además, sobre esta cepa se han desarrollado modelos de enfermedad de interés diversos campos, como el de la inmunosupresión, el envejecimiento, cáncer y muchos otros [Goncalves *et al.*, 2017; Sanches *et al.*, 2018; Song and Hwang, 2017].

En el mercado existen modelos basados en esta cepa con la microbiota intestinal humanizada, que reducen la variabilidad entre individuos y permiten disponer de una composición conocida de la microbiota. Sin embargo, en este trabajo se optó por modelos de microbiota murina ya que se deseaba enfrentar la capacidad de las cepas en estudio frente a la microbiota naturalmente adaptada a crecer en el intestino del ratón. Las pequeñas diferencias en la estructura intestinal y las diferencias en la dieta pueden alterar la capacidad de “Resistencia a la colonización” en modelos humanizados. Por otro lado, las similitudes en la composición de la microbiota de ratones y humanos y el papel de los principales filos, Bacteroidetes y Firmicutes, es compartido y conocido. Por lo que el mecanismo de “Resistencia a la colonización” y alteración de la microbiota por los antibióticos debe afectar de manera similar en ambas especies. Además, este trabajo no se centra en las especies bacterianas implicadas en estos fenómenos, pues las observaciones son fenotípicas. En un futuro, se podrán emplear estos modelos para analizar el papel concreto de diferentes poblaciones bacterianas en la resistencia a la colonización o en la transmisión ya que también dispone de modelos comerciales de esta cepa de ratón libres de bacterias y de patógenos oportunistas específicos. Estos modelos podrán ser combinados con técnicas avanzadas de secuenciación masiva.

En el primer apartado de resultados de esta tesis, se presentan dos modelos animales que buscan incrementar los conocimientos disponibles sobre el brote causado por O48PKp que comenzó en 2013 y 2014 en el HULP. En los últimos 30 años, brotes de este tipo han sido frecuentemente descritos en hospitales de toda Europa, y se sabe que en el pasado cepas resistentes a Gentamicina fueron controladas con cambios en la política de uso de antibióticos [Zwet *et al.*, 1999]. A medida que se extendieron nuevas cepas de Kp con perfiles de resistencia más complejos, la dificultad para controlar estos brotes se

incrementó [*van 't Veen et al.*, 2005]. En el caso del brote descrito por Van't Veen y colaboradores que fue satisfactoriamente controlado, cabe destacar que el centro es un hospital provincial con menos de la mitad de capacidad que el HULP. Otros casos de éxito similares en los que se consiguió controlar un brote de este tipo, incluyen la relocalización del hospital en un nuevo edificio dentro de los factores que influyeron en el control del brote [*Dautzenberg et al.*, 2014]. En 2015, los costes estimados para un brote de características similares a las del brote del HULP fueron de 804.263 dólares [*Mollers et al.*, 2017].

Como se puede observar en la descripción de la evolución del brote, las medidas de higiene y control consiguieron una reducción de nuevos casos hasta que, en 2017, el número fue similar al año anterior. La estabilización en el número de nuevos casos puede ser explicada por diferentes factores: (i) que las medidas implementadas no sean suficientes para controlar la diseminación de CPKp y *bla*<sub>oxa48</sub> en el hospital, (ii) que se ha incrementado la diseminación de esta bacteria y este plásmido en la comunidad por lo que acceden más pacientes al hospital que ya portan la bacteria en el momento del ingreso y (iii) que se haya seleccionado una población específica u otras EntBac capaces de evadir las medidas de control propuestas. Cabe destacar que cada año se detectan al menos 100 nuevos pacientes colonizados o infectados por EntBac portadoras de pOXA48. La búsqueda de factores que pudieran dar respuesta a estas preguntas centraron los modelos en la investigación del proceso de colonización y la transmisión horizontal de este plásmido.

En estos modelos, como se menciona anteriormente, para reducir la probabilidad de desarrollo de enfermedad se seleccionó una cepa coisogénica, como C57BL/6 que

tradicionalmente ha presentado mayores niveles de resistencia a la enfermedad y, además existen modelos de enfermedad que incrementan potencial de desarrollo en un futuro. Como se observa en los resultados, no hubo síntomas clínicos después de la administración del inóculo a los ratones, esto respeta lo que es consistente con el carácter oportunista de esta bacteria en el hospital, que incluso con la elevada prevalencia, en el caso del modelo elevada concentración, no causan enfermedad en individuos sanos. Cabe destacar que solo uno de los ratones inoculado con ST11 presentó excreción diaria durante 28 días y tampoco mostró síntomas clínicos.

Para incrementar la información disponible sobre las cepas de O48PKp causantes del brote del HULP, se analizó la capacidad de colonización y excreción de los dos ST mayoritarios participantes en este brote, ST11 y ST405. En el primer modelo, ambos secuenciotipos estudiados presentaron diferentes tendencias en los patrones de excreción, donde las mayores tasas de eliminación se observaron en ST405 durante los primeros 4 días. La alta variabilidad individual impide la obtención de resultados significativos, por lo que sólo las tendencias pueden ser observadas, esto es debido en gran medida al elevado número de animales negativos inoculados con ST11. Esta diferencia puede sugerir que el ST405 podría detectarse más fácilmente mediante hisopos rectales (medida empleada en el hospital) debido a su elevada excreción, por lo que sería más fácil de controlar. Por otro lado, la duración del periodo de excreción de ST405 fue dos días menos que la de ST11 pudiendo esta ser otra de las razones que explique su éxito y su facilidad de diseminación por el hospital.

Estos modelos, al igual que en la clínica, se enfrentan a uno de los desafíos más críticos de un programa de control de brotes; la detección de portadores ("Directrices de la



Organización Mundial de la Salud (OMS) aprobadas por el Comité de Revisión de Directrices," 2017). Como se muestra, los métodos analíticos específicos utilizados en este trabajo no detectan a los individuos con baja colonización que vuelven a ser detectados después del tratamiento antibiótico en el segundo experimento.

Posteriormente, debido a la importancia del brote en estudio, los resultados obtenidos en el primer experimento de colonización y la importancia de este ST en brotes en toda Europa, se procedió a investigar en profundidad el ST11. Para ello, se introdujeron modificaciones en la cantidad de heces recogidas, los días de seguimiento y el tratamiento con Amoxicilina. Concretamente, el ST11 que ha desplazado al ST405 en el hospital, presentó una dinámica de excreción con una duración un 50% mayor y está extendido por hospitales de toda España y el Mediterráneo y está estrechamente relacionado con ST258, uno de los clones causantes de brotes nosocomiales en hospitales en todo el mundo [David *et al.*, 2019].

Para compensar la dificultad en la detección de portadores con baja colonización puesta de manifiesto en el primer modelo se incrementó la cantidad de heces muestreadas, ya que en el primer modelo (potencial colonizador de los dos clones más prevalentes), se recogieron diariamente catorce gránulos de heces de las jaulas y en el segundo modelo, todas las muestras fecales diarias de los ratones se tomaron aumentando el número de individuos detectados. Por eso, los niveles de ST11 observados en el segundo modelo fueron más altos en comparación con los detectados en el primer modelo. Además, ya que los resultados se ponderan por cantidad de heces totales, estos resultados indican también que la excreción no es homogénea y que no todos los pellets de heces eliminados por los ratones poseen la misma concentración de bacterias.

Continuando con el segundo modelo presentado en esta tesis, cuando los ratones que son negativos a las pruebas de detección, es decir “no colonizados”, son tratados con Amoxicilina vuelven a excretar altos niveles de O48PKp, esto refuerza el supuesto antes planteado sobre la detección de portadores y el riesgo de que estos no sean detectados. Como se observa en el modelo, el tratamiento antibiótico aumenta la selección positiva de estos clones y el aumento de los niveles de O48PKp en las heces. Si esto se traslada hipotéticamente al ambiente hospitalario, podemos suponer que esos pacientes colonizados que no son detectados, cuando son admitidos a una zona libre de pOXA48 del hospital y son tratados con uno de los antibióticos más utilizados, como la Amoxicilina, incrementan el porcentaje de bacterias excretadas y el riesgo de transmisión e infección, aumentando de esta manera la transmisión intrahospitalaria y la aparición de nuevos casos.

Esto podría ser una explicación de por qué no se están reduciendo los nuevos pacientes clínicos y por qué las medidas de muestreo rutinario actuales no controlan eficazmente el brote nosocomial. Además, es importante destacar que el tratamiento con Amoxicilina no solo favorece la colonización del intestino por O48PKp, sino que también permite detectar la transmisión horizontal de este plásmido a otras EntBac, como *E. coli*.

Estos resultados pueden indicar que: (i) los eventos de conjugación ocurren de manera natural pero no hay suficiente frecuencia o concentración para ser detectados, (ii) la Amoxicilina puede seleccionar transconjugantes de la microbiota de ratón y (iii) la eliminación de competidores de la microbiota puede permitir un crecimiento suficiente de bacterias transconjugantes por encima del límite de detección. Nuevos experimentos deben ser definidos para investigar si el uso de antibióticos incrementa la frecuencia de

conjugación o solamente elimina la microbiota intestinal competidora y selecciona los individuos resistentes.

A la vista de los resultados de este modelo, se sugiere que la diseminación nosocomial puede no estar bajo control por las diversas medidas de higiene introducidas en el hospital y que los pacientes con colonización baja escapen a las medidas de detección incrementando la transmisión intrahospitalaria. Por otro lado, se ha propuesto a los nuevos individuos colonizados en la comunidad como una de las razones por la cual la diseminación de O48PKp es extremadamente difícil de controlar solo con medidas hospitalarias, poniendo el foco en los pacientes de más edad que conviven en residencias y que ingresan cíclicamente en el hospital [*Pano-Pardo et al.*, 2016]. Además, es posible que estos pacientes se identifiquen erróneamente como pacientes nuevos con O48PKp que han sido colonizados en el hospital en lugar de en la comunidad y que se detecten solo cuando hay un proceso infeccioso o después de la administración de un antibiótico.

En el modelo desarrollado en este trabajo que analiza la transmisión por contacto directo se observa como esta bacteria es transmitida sin que el tratamiento con antibióticos sea un requisito obligatorio por lo que estas transmisiones en la comunidad deben ser tenidas en cuenta. La combinación de ambos, y la investigación de los factores implicados en la colonización, pueden servir en el futuro para clasificar a los pacientes por el riesgo de ser colonizados según su historial y reducir el riesgo de transmisión y colonización.

En resumen, este modelo de colonización es capaz de aportar nueva información de utilizad para avanzar en el control del brote nosocomial; en primer lugar, está en línea

con el carácter oportunista de esta bacteria; en segundo lugar, los ratones inoculados eliminan diferentes niveles de O48PKp dependiendo del ST inoculado durante un número diferente de días, siendo esta una posible explicación del éxito de ST11 sobre ST405; en tercer lugar, la dificultad en la detección de portadores con bajos niveles de colonización refleja uno de los principales problemas dentro de un programa de erradicación de un brote; en cuarto lugar, se analiza el efecto de la Amoxicilina sobre la microbiota intestinal portadora de pOXA48 que incrementa sus niveles por encima de los límites de detección; y por último se demuestra la transferencia horizontal de pOXA48 a la microbiota del ratón lo que pone de manifiesto el carácter epidémico del plásmido.

En el futuro, se nuevos trabajos realizarán basados en los resultados actuales, centrados en el desarrollo de nuevas terapias para la descolonización como los fagos, mejora de los métodos de detección de portadores y el diseño de terapias antibióticas profilácticas que reduzcan el riesgo de sobrecrecimiento de bacterias portadoras de pOXA48. Además de estas medidas que permitan mejorar en el control de la diseminación de O48PKp, a la vista de los resultados obtenidos en este trabajo se podría plantear el desarrollo y administración de COIN que disminuyan el riesgo de diseminación del plásmido a otras bacterias que se escapan de los programas de control y que actúan como reservorios.

Hasta este punto solo se ha profundizado en los individuos ya colonizados por O48PKp y en las principales causas que impiden controlar la diseminación de este patógeno por el hospital causando el brote discutido anteriormente. Sin embargo, no se ha discutido todavía el factor clave para la diseminación de estas bacterias, la transmisión. La vía

fecal-oral es la forma más común por la que una bacteria es transmitida de un individuo a otro [de Graaf *et al.*, 2017]. Existen multitud de modelos de cohabitación donde un individuo enfermo es alojado junto con otros sanos, los cuales posteriormente por contacto se transmiten la enfermedad. En estos experimentos, individuos sanos contactan tanto con el infectado como con sus secreciones y excreciones lo que hace difícil caracterizar los contactos necesarios para que la transmisión se lleve a cabo.

Como se indica en la introducción, se han desarrollado diversos modelos matemáticos para analizar este aspecto basados en la observación [Duval *et al.*, 2019]. Estos métodos, carecen de la capacidad de intervención, además de haber multitud de variables que no pueden ser controladas [Gaivao *et al.*, 2017]. Por todo esto, en este trabajo se ha desarrollado un modelo animal que permita observar, medir y caracterizar la transmisión de bacterias por contacto boca a boca.

Tanto en la comunidad como en el hospital se producen multitud de contactos directos entre individuos donde puede ocurrir un fenómeno de transmisión. Siendo la transmisión fecal-oral una de las vías de transmisión más frecuente, se deben considerar los niveles de higiene de la comunidad en estudio, teniendo en cuenta que los mayores niveles se deben esperar en centros hospitalarios en las áreas donde se encuentren pacientes inmunodeprimidos. Es en estas áreas donde es crítico caracterizar la transmisión y los factores que influyen para proteger adecuadamente a estos pacientes. En este trabajo, se desarrolló un sistema de alojamiento que permitiera este tipo de contactos pero que aislara a los individuos del contacto con secreciones o excreciones contaminadas.

Existen diversos estudios epidemiológicos que identifican el ambiente hospitalario como el principal punto de diseminación de CPKp [David *et al.*, 2019]. Principalmente estos estudios se basan en datos retrospectivos recogidos en el hospital durante un periodo de tiempo, que no permiten intervención directa, observándose la importancia de la transmisión intrahospitalaria [Kola *et al.*, 2007]. El sistema de alojamiento descrito en los resultados se diseñó pensando en el contacto entre el personal hospitalario, los familiares y los pacientes. En planteamiento de la estructura buscaba representar una planta de un hospital donde diferentes pacientes estuvieran alojados de manera aislada siendo su único punto de contacto el personal médico. Este planteamiento no busca identificar al personal hospitalario como responsable de la transmisión de bacterias, ya que esto ha sido tratado antes en otros estudios, sino modelizar una situación real que ocurre a diario en todos los hospitales del mundo [Prospero *et al.*, 2010]. Para ello, se dispusieron 5 cubetas adyacentes a una cubeta central. Estas 5 cubetas son independientes entre sí, pero están conectadas a la cubeta central mediante orificios, que son el único punto de interacción entre los animales alojados en el sistema.

Este alojamiento permite definir las tres figuras de interés: el donador, el transmisor y el receptor; pudiéndose simplificar en donador/transmisor y receptor. Además, permite realizar varias réplicas con un mismo donador (transmisor) y varios receptores. En este aspecto, cabe discutir si realizando construcciones más simples de dos cubetas con un donador (transmisor) y un receptor se obtendrían ambientes más homogéneos de contacto y con mayor simplicidad a la hora de ser analizados. En el alojamiento actual se reduce el número de donadores necesarios, pues por cada 5 receptores hay un donador/transmisor, cumpliendo con uno de los principios de las 3R (reducción). Por otro lado, la obtención de animales donadores colonizados no es proceso sencillo y la

variabilidad observada entre individuos en los modelos anteriores se ve reducida al emplear solo un animal en esta función para más receptores.

Otra de las ventajas del alojamiento diseñado es la posibilidad de facilitar agua y bebida de manera independiente a cada animal. Está descrito como las fuentes de agua, como grifos o sumideros, pueden actuar como reservorio de CPKp, siendo esto un riesgo para los pacientes [Kizny Gordon *et al.*, 2017]. Del mismo modo la comida puede ser un foco de transmisión de bacterias que son ingeridas con la misma cuando está contaminada. Adicionalmente existen modelos animales cuyas patologías se inducen mediante la dieta, lo que requiere un área de alimentación específica que se puede llevar a cabo en este sistema de alojamiento.

Para establecer el sistema de contacto planteado en el diseño se requería la interacción entre el ratón alojado en el centro y los de las cubetas adyacentes. Según la estructura social de los ratones, para animales de un mismo sexo, los machos adultos se pelearían constantemente por el territorio hasta la muerte, mientras que una hembra se asociaría a una o dos hembras más para crear una colonia. Por otro lado, machos y hembras interactúan compartiendo territorio aunque estas carecen de carácter exploratorio y nunca explorarían territorios dominados por un macho desconocido [Lund, 1975].

Para este modelo era necesario crear una estructura social que asegurara el contacto entre los individuos alojados. Por este motivo y debido a las restricciones de los grupos de un mismo sexo se decidió mezclar ambos. Según los resultados mostrados, en el alojamiento se establece una estructura social en los dos grupos en estudio con variaciones en el número de contactos dependiendo de la distribución de los animales en las cubetas individuales. Cuando una hembra se sitúa en el centro establece una

estructura social de contacto con dos ratones macho principales, mientras que, el macho establece una rutina de contacto con todas las hembras del alojamiento. Por todo esto, el potencial uso del sistema de alojamiento para estudios de interacción social debe ser analizado en el futuro.

Una vez establecido el sistema de contacto se procedió a seleccionar la cepa que se emplearía para comprobar la eficacia del sistema de alojamiento en el estudio de la transmisión de bacterias por contacto directo. Con objeto de continuar el estudio de CPKp se evaluaron diferentes cepas para ser empleadas en el sistema. A continuación, se priorizaron aquellas cepas que presentaran perfil de resistencia frente a antibióticos que pudieran ser administrados en el agua, con el objetivo de reducir el posible sufrimiento causado por la administración intraperitoneal de antibióticos a los ratones, reducir el manejo y afectar lo menor posible al comportamiento natural de los mismos. Las cepas empleadas en los experimentos anteriores presentaban resistencia a Amoxicilina, pero el hecho de portar la carbapenemasa en un plásmido conjugativo incrementaba la posible variabilidad del sistema. Esto se puso de manifiesto en una de las pruebas piloto, cuando se inoculó el donador con el clon ST11 del HULP y se detectaron varios transconjugantes del plásmido que fueron identificados como *K. oxytoca* (resultados sin publicar). Como se demuestra en este trabajo, esta dificultad podría ser atajada mediante inhibidores de la conjugación, que permitirían realizar este procedimiento en el futuro.

Por esto, se decidió seleccionar otra cepa nosocomial de CPKp de un ST altamente relacionado y más prevalente como es ST258. Además, esta cepa es portadora de la carbapenemasa *bla*<sub>KPC3</sub> en un plásmido no conjugativo y es intrínsecamente resistente



a colistina, de esta manera se disponía de un antibiótico para la selección en placa y un antibiótico como la Colistina para la selección en el modelo. La Colistina es uno de los antibióticos de último recurso empleados en el tratamiento de esta CPKp y el hecho de detectar resistencia a la misma está asociado a una mayor mortalidad [*Menekse et al.*, 2019].

Una vez seleccionada la cepa se procedió a la realización de 9 réplicas, en las 8 primeras se grabó solamente hasta la hora 17, mientras que en la última se grabó hasta la hora 24, tras una mejora en el sistema de grabación en la que se incrementó la capacidad de la memoria de la cámara. Como se observa en la tabla 5, existe una mayor variación entre replicas que la observada en los experimentos realizados para establecer la estructura de la población de contacto. Esto puede ser debido a que la inoculación de la cepa en estudio puede alterar el comportamiento del donador. Esta interacción puede disminuir a partir de la hora 15, momento en el que se observan mayor número de contactos. Esta hipótesis se refuerza cuando en la última réplica se producen un mayor número de contactos en la hora 19, superando los obtenidos en cualquier hora anterior. Por todo esto las futuras réplicas deben ser realizadas con el mayor tiempo de grabación posible para incrementar la probabilidad de contacto y por tanto de transmisión. Además, a mayor número de horas habrá una mayor cantidad de heces en la jaula y debido al comportamiento coprofágico del ratón se puede producir un efecto acumulativo en el ambiente que incremente la frecuencia de transmisión.

	<i>Tot_Con</i>	<i>Tot_time</i>	<i>DIF_Tim_Con</i>
<i>Promedio</i>	18,1777778	29,7777778	1,386076659
<i>Des. Esta.</i>	16,518982	27,2929302	0,778522669

**Tabla 5. Medias y Desviaciones estándar de los tres valores principales registrados.** Según se incluyen nombraron en el programa de análisis, “Tot\_Con” indica el número de contactos totales, “Tot\_time” representa el tiempo total de contacto y “DIF\_Tim\_Con” representa el tiempo total de contacto dividido entre el número total de contactos.

De la población en riesgo, un 13% adquirió la bacteria inoculada al donador por contacto boca a boca. Extrapolando, esto podría servir para estimar que 13 de cada 100 pacientes podrían colonizarse si un médico colonizado entra en contacto con ellos. Realizar esta afirmación en un estado tan precoz del desarrollo del sistema es excesivamente audaz, pero en un futuro este sistema podría servir para comparar el riesgo relativo de diferentes bacterias a ser transmitidas por contacto. También, la información obtenida en el modelo puede emplearse para estimar valores epidemiológicos, como el ritmo reproductivo básico, si se realiza el seguimiento durante más tiempo y se registran los periodos finales de descolonización.

Por otro lado, es importante destacar que ningún animal adquirió la cepa de KPCPKp por contacto con el orificio o con el ambiente, por lo que el donador tuvo un papel fundamental en el proceso. También, es importante resaltar que de los animales que resultaron colonizados, el 83,33% recibió un tratamiento de clindamicina antes de comenzar los contactos para desestabilizar la microbiota intestinal y, que el 66,67% de ellos recibió un tratamiento de colistina con el objetivo de seleccionar la bacteria que se deseaba transmitir. Solo en uno de los seis casos se detectó transmisión sin aplicar ningún tratamiento antibiótico.

En resumen, el sistema de alojamiento desarrollado es capaz de modelizar la transmisión de bacterias por contacto directo boca a boca. Se ha obtenido una población de contacto constante y homogénea. En el modelo descrito se observa como la diseminación de uno de los secuenciotipos (ST258) más prevalentes de Kp se ve facilitada, en lugar de limitada por el uso de antibióticos. Los factores que influyen en esta transmisión y las características de los contactos deben ser investigados en profundidad para obtener conclusiones significativas, pero se observa que posiblemente el tiempo de contacto sea un factor crítico en la transmisión. En el futuro, una vez comprendidos los factores que incrementan el riesgo de transmisión bacteriana, se podrá dar el paso a investigar la transmisión de plásmidos que codifican importantes genes de resistencia como el estudiado en los dos modelos anteriores.

En el último modelo presentado en esta tesis, se investiga el potencial del 2HDA como inhibidor de la conjugación bacteriana. Este compuesto se encuadra dentro de los ácidos grasos insaturados sintéticos, cuyas propiedades como inhibidores han sido estudiadas *in vitro* [Getino *et al.*, 2016]. Incluso, los mecanismos de acción han sido descritos en varias publicaciones, encontrándose cierta especificidad entre los compuestos y los diferentes grupos de incompatibilidad plasmídica [Buckner *et al.*, 2018], siendo destacable el efecto del 2HDA interfiriendo en la transmisión de plásmidos IncF [Getino *et al.*, 2015]. En estos trabajos que emplearon radio marcaje y modelización informática, y se identificó que estos ácidos son capaces de interrumpir el sistema de secreción tipo IV que es fundamental para la conjugación bacteriana [García-Cazorla *et al.*, 2018]. Los ácidos grasos insaturados como el 2HDA son difíciles de sintetizar y las propiedades de los mismos aún están siendo estudiadas, por eso se decidió comenzar el desarrollo del modelo con un análogo natural como es el ácido linoleico.

En primer lugar, se debía comprobar la supervivencia en el ratón de las bacterias empleadas en el experimento en placa realizado el laboratorio. La cepa MDS52 de *E. coli* dispone del contenido genético necesario y suficiente para sobrevivir en el laboratorio y, por ejemplo, carece de secuencias de inserción y de mecanismos de adaptación genéticos que permitan adaptarse al estrés, por lo que su capacidad para atravesar el tracto intestinal no estaba garantizada. Sin embargo, como podemos observar en el modelo esta bacteria sobrevive sin dificultad a su paso por el intestino y es capaz de conjugarse en este. Profundizando en este aspecto, en los tres grupos se observa un mayor número de células receptoras que donadoras, esto podría ser explicado por el coste biológico del plásmido que dificulta la adaptación de esta bacteria al nuevo ambiente.

El siguiente aspecto a valorar era la capacidad de estos compuestos para actuar en el ambiente intestinal. En los experimentos del laboratorio, tanto la donadora como la receptora entran en contacto siempre en presencia del compuesto, por lo que se decidió añadir este al PBS donde se suspendió el inóculo inmediatamente antes de administrárselo a los ratones. En los experimentos presentados, tanto el ácido linoleico como el 2HDA causan un efecto significativo en la frecuencia de conjugación en el intestino. En el caso del ácido linoleico, aunque el número de transconjugantes sea menor que el observado en el grupo control, se observa un aumento en la frecuencia de conjugación, este aumento es debido a que el número de donadoras y receptoras es menor que en los otros dos grupos. En el grupo tratado con 2HDA se observa una disminución del número de transconjugantes y una disminución de la frecuencia de conjugación tal y como se observaba *in vitro*. El sistema de detección en placa, en el que se aplican diferentes concentraciones antibióticas, restringe en gran medida la

detección de bacterias transconjugantes procedentes de la microbiota intestinal del ratón.

En este punto, cabe preguntarse, si existe la posibilidad de que estos compuestos estén actuando antes de la inoculación bloqueando la actividad conjugativa, de manera inmediata, en las células donadoras en el caso del 2HDA o causando un efecto bactericida en el caso del ácido linoleico antes de ser inoculado. Esto actuaría sobre las bacterias del inóculo, pero estos efectos no afectarían a generaciones posteriores pudiéndose observar los mismos efectos. Sin embargo, en los ensayos *in vitro* publicados anteriormente con estos compuestos no se observa un efecto bactericida de ninguno de ellos [Fernandez-Lopez *et al.*, 2005]. Además, se describió como la realización de pretratamientos no influía en la frecuencia de conjugación pues el compuesto debe estar presente en el momento en el que ocurre la formación del pelo sexual que actúa de puente entre las dos células [Getino *et al.*, 2015], descartando por tanto estas posibilidades. Nuevos estudios deben ser realizados para explicar el efecto causado por el ácido linoleico, que podría ser explicado por una estimulación del sistema inmune que incremente la destrucción de bacterias o una interrupción del metabolismo de las bacterias inoculadas que reduzca su frecuencia de multiplicación.

En resumen, en este modelo conseguimos replicar los resultados obtenidos en el laboratorio. En primer lugar, tanto la bacteria donadora como la receptora son capaces de sobrevivir y conjugarse en el modelo. En segundo lugar, el sistema de detección en placa es capaz de detectar los transconjugantes ocurridos en el ratón sin necesidad de aplicar ningún tratamiento antibiótico como ocurre en el modelo antes presentado. El

ácido graso insaturado 2HDA es capaz de reducir la frecuencia de conjugación *in vivo* de pOXA38 en este modelo.

En esta tesis, se aborda la complejidad de la ecología de la resistencia a antibióticos desde diferentes perspectivas. En primer lugar, se aborda la colonización como requisito primero de cualquier bacteria para desarrollarse en nuevo nicho. Esta colonización tiene lugar sin necesidad de alterar la microbiota intestinal, pues las bacterias empleadas son capaces de vencer la resistencia a la colonización.

Los resultados obtenidos en esta tesis pueden ejemplarizar el proceso de expansión de determinantes de resistencia mediada por antibióticos. En un ambiente cualquiera pueden existir determinantes de resistencia a antibióticos en diferentes especies bacterianas, que pueden ser transferidas y colonizar nuevos ambientes de manera natural. Los antibióticos seleccionan estas poblaciones y favorecen su transmisión, así como seleccionan aquellas nuevas bacterias que han adquirido los determinantes de resistencia. Si los antibióticos no se aplican, el número de bacterias resistentes disminuye, pero no desaparece, y los determinantes de resistencia prevalecen en la población. En los resultados mostrados en esta tesis, Kp es capaz de transmitirse de un ratón a otro por contacto directo sin necesidad de realizar un tratamiento antibiótico. Cuando se emplean estas terapias, se incrementa la frecuencia de transmisión y se incrementa el porcentaje de Kp en heces, pero este porcentaje disminuye en el tiempo. Cuando se aplica de nuevo un tratamiento antibiótico los niveles de bacterias resistentes se vuelven a incrementar, así como el número de especies en las que el determinante de resistencia se detecta. Por último, volviendo a los resultados de la tesis, en todos los modelos desarrollados los antibióticos son fundamentales para seleccionar las bacterias

con las que estamos trabajando y diferenciarlas del resto de la microbiota. Por todo esto, los antibióticos deben ser utilizados con responsabilidad pues tienen un papel fundamental en el mantenimiento de su eficacia y en la viabilidad de la Salud Única tal y como la conocemos.

# Conclusiones

Empieza por el principio - dijo el Rey con gravedad - y sigue hasta llegar al final; allí te paras.

Lewis Carroll "Alicia en el País de las Maravillas"





Las conclusiones de esta tesis doctoral son las siguientes:

1-En el modelo murino de colonización desarrollado en este trabajo se han puesto de manifiesto las diferencias fenotípicas de los dos principales secuenciotipos de *Klebsiella pneumoniae* productora de *bla*<sub>OXA48</sub>, ST11 y ST405, que causan el brote nosocomial del Hospital Universitario de la Paz, identificándose un perfil de eliminación dos y tres veces mayor en ST405 que en ST11 en los primeros 4 días y una persistencia 7 días mayor de ST11 en comparación con ST405.

2-La administración de un tratamiento de Amoxicilina 17 días después de la administración del inóculo bacteriano y cuando el 90% de los animales no presentaba eliminación en heces, incrementa los niveles de excreción de ST11 permitiendo alcanzar los niveles suficientes para ser detectada en todos los individuos tratados al menos una vez en los siguientes 11 días.

3-El plásmido pOXA48 es capaz de diseminarse a cepas de *E. coli* de la microbiota del ratón. Esta diseminación es detectada posterior a la administración de un tratamiento de Amoxicilina.

4-El alojamiento diseñado en este trabajo y la estructura social planteada permiten la transmisión de *Klebsiella pneumoniae* productora de *bla*<sub>KPC3</sub> por contacto directo boca a boca entre ratones. La duración de los contactos y el uso de antibióticos parecen ser los factores que más influyen en la transmisión, aunque estos no son limitantes.

5-El ácido 2-hexadecanoico disminuye la frecuencia de conjugación *in vivo* del plásmido pOXA38 en el modelo murino diseñado.



# Referencias

La ignorancia engendra más confianza de la que con frecuencia engendra el conocimiento: son aquellos que saben poco, y no aquellos que saben mucho, los que afirman positivamente que tal o cual problema jamás podrá ser resuelto por las ciencias.

Charles Darwin



Adam, L., M. López-González, A. Björk, S. Pålsson, C. Poux, M. Wahren-Herlenius, C. Fernández, and A.-L. Spetz (2018), Early resistance of non-virulent mycobacterial infection in C57BL/6 mice is associated with rapid up-regulation of antimicrobial cathelicidin camp, *Frontiers in Immunology*, 9(1939), doi: 10.3389/fimmu.2018.01939.

Al-Nassir, W. N., A. K. Sethi, Y. Li, M. J. Pultz, M. M. Riggs, and C. J. Donskey (2008), Both oral metronidazole and oral vancomycin promote persistent overgrowth of vancomycin-resistant enterococci during treatment of *Clostridium difficile*-associated disease, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(7), 2403-2406, doi: 10.1128/aac.00090-08.

Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman (1990), Basic local alignment search tool, *Journal of molecular biology*, 215(3), 403-410, doi: 10.1016/s0022-2836(05)80360-2.

Álvarez, J., J. Bezos, M. L. de la Cruz, C. Casal, B. Romero, L. Domínguez, L. de Juan, and A. Pérez (2014), Bovine tuberculosis: Within-herd transmission models to support and direct the decision-making process, *Research in Veterinary Science*, 97, S61-S68, doi: <https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2014.04.009>.

Bachmanov, A. A., D. R. Reed, G. K. Beauchamp, and M. G. Tordoff (2002), Food intake, water intake, and drinking spout side preference of 28 mouse strains, *Behav Genet*, 32(6), 435-443.

Bassetti, M., E. Righi, A. Carnelutti, E. Graziano, and A. Russo (2018), Multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae*: challenges for treatment, prevention and infection control, *Expert review of anti-infective therapy*, 16(10), 749-761, doi: 10.1080/14787210.2018.1522249.

Bauer, T. M., E. Ofner, H. M. Just, H. Just, and F. D. Daschner (1990), An epidemiological study assessing the relative importance of airborne and direct contact transmission of microorganisms in a medical intensive care unit, *The Journal of hospital infection*, 15(4), 301-309.

Bialek-Davenet, S., et al. (2014), Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups, *Emerging infectious diseases*, 20(11), 1812-1820, doi: 10.3201/eid2011.140206.

Bocanegra-Ibarias, P., E. Garza-Gonzalez, R. Morfin-Otero, H. Barrios, L. Villarreal-Trevino, E. Rodriguez-Noriega, U. Garza-Ramos, S. Petersen-Morfin, and J. Silva-Sanchez (2017), Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying *Enterobacteriaceae* in Mexico, *PloS one*, 12(6), e0179651, doi: 10.1371/journal.pone.0179651.

Boralevi, L. C. (1984), *Bentham and the Oppressed*, W. de Gruyter.

Bosch, T., et al. (2017), Outbreak of NDM-1-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Dutch Hospital, with Interspecies Transfer of the Resistance Plasmid and Unexpected Occurrence in Unrelated Health Care Centers, *Journal of clinical microbiology*, 55(8), 2380-2390, doi: 10.1128/jcm.00535-17.

Bouvier, N. M., A. C. Lowen, and P. Palese (2008), Oseltamivir-resistant influenza A viruses are transmitted efficiently among guinea pigs by direct contact but not by aerosol, *J Virol*, 82(20), 10052-10058, doi: 10.1128/JVI.01226-08.

Bravo de Rueda, C., M. C. M. de Jong, P. L. Eblé, and A. Dekker (2015), Quantification of transmission of foot-and-mouth disease virus caused by an environment contaminated with secretions and excretions from infected calves, *Veterinary research*, 46(1), 43-43, doi: 10.1186/s13567-015-0156-5.

Brielmeier, J. S. (2004-08-31), US6782845B1.

Brinkac, L., A. Voorhies, A. Gomez, and K. E. Nelson (2017), The threat of antimicrobial resistance on the human microbiome, *Microb Ecol*, 74(4), 1001-1008, doi: 10.1007/s00248-017-0985-z.

Buckner, M. M. C., M. L. Ciusa, and L. J. V. Piddock (2018), Strategies to combat antimicrobial resistance: anti-plasmid and plasmid curing, *FEMS Microbiol Rev*, 42(6), 781-804, doi: 10.1093/femsre/fuy031.

Burns, J. H., and H. L. A. Hart (2015), *An Introduction to the Principles of Morals and Legislation*.

Cannatelli, A., A. Santos-Lopez, T. Giani, B. Gonzalez-Zorn, and G. M. Rossolini (2015), Polymyxin resistance caused by mgrB inactivation is not associated with significant biological cost in *Klebsiella pneumoniae*, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(5), 2898-2900, doi: 10.1128/AAC.04998-14.

Cantas, L., S. Q. A. Shah, L. M. Cavaco, C. M. Manaia, F. Walsh, M. Popowska, H. Garelick, H. Bürgmann, and H. Sørum (2013), A brief multi-disciplinary review on antimicrobial resistance in medicine and its linkage to the global environmental microbiota, *Frontiers in microbiology*, 4, 96-96, doi: 10.3389/fmicb.2013.00096.

Czuprynski, C. J., N. G. Faith, and H. Steinberg (2003), A/J mice are susceptible and C57BL/6 mice are resistant to *Listeria monocytogenes* infection by intragastric inoculation, *Infection and immunity*, 71(2), 682-689, doi: 10.1128/iai.71.2.682-689.2003.

D'Costa, V. M., K. M. McGrann, D. W. Hughes, and G. D. Wright (2006), Sampling the antibiotic resistome, *Science (New York, N.Y.)*, 311(5759), 374-377, doi: 10.1126/science.1120800.

Dallenne, C., A. Da Costa, D. Decré, C. Favier, and G. Arlet (2010), Development of a set of multiplex PCR assays for the detection of genes encoding important  $\beta$ -lactamases in Enterobacteriaceae, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 65(3), 490-495, doi: 10.1093/jac/dkp498.

Dautzenberg, M. J., et al. (2014), Successful control of a hospital-wide outbreak of OXA-48 producing Enterobacteriaceae in the Netherlands, 2009 to 2011, *Euro surveillance : bulletin European sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 19(9), doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.9.20723.

David, S., et al. (2019), Epidemic of carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* in Europe is driven by nosocomial spread, *Nature microbiology*, doi: 10.1038/s41564-019-0492-8.  
de Graaf, M., R. Beck, S. M. Caccio, B. Duim, P. Fraaij, F. S. Le Guyader, M. Lecuit, J. Le Pendu, E. de Wit, and C. Schultsz (2017), Sustained fecal-oral human-to-human transmission following a zoonotic event, *Current opinion in virology*, 22, 1-6, doi: 10.1016/j.coviro.2016.11.001.

Denayer, T., T. Stöhr, and M. Van Roy (2014), Animal models in translational medicine: Validation and prediction, *New Horizons in Translational Medicine*, 2(1), 5-11, doi: <https://doi.org/10.1016/j.nhtm.2014.08.001>.

Deng, Y.-Q., et al. (2017), Intranasal infection and contact transmission of Zika virus in guinea pigs, *Nat Commun*, 8(1), 1648-1648, doi: 10.1038/s41467-017-01923-4.

Duval, A., T. Obadia, P. Y. Boelle, E. Fleury, J. L. Herrmann, D. Guillemot, L. Temime, and L. Opatowski (2019), Close proximity interactions support transmission of ESBL-K. pneumoniae but not ESBL-E. coli in healthcare settings, *PLoS computational biology*, 15(5), e1006496, doi: 10.1371/journal.pcbi.1006496.

Eckburg, P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. A. Relman (2005), Diversity of the human intestinal microbial flora, *Science* (New York, N.Y.), 308(5728), 1635-1638, doi: 10.1126/science.1110591.

Edenborough, K. M., B. P. Gilbertson, and L. E. Brown (2012), A mouse model for the study of contact-dependent transmission of influenza A virus and the factors that govern transmissibility, *J Virol*, 86(23), 12544-12551, doi: 10.1128/jvi.00859-12.

Faith, J. J., N. P. McNulty, F. E. Rey, and J. I. Gordon (2011), Predicting a human gut microbiota's response to diet in gnotobiotic mice, *Science* (New York, N.Y.), 333(6038), 101-104, doi: 10.1126/science.1206025.

Fernandez-Lopez, R., C. Machon, C. M. Longshaw, S. Martin, S. Molin, E. L. Zechner, M. Espinosa, E. Lanka, and F. de la Cruz (2005), Unsaturated fatty acids are inhibitors of bacterial conjugation, *Microbiology* (Reading, England), 151(Pt 11), 3517-3526, doi: 10.1099/mic.0.28216-0.

Franco, N. H. (2013), Animal Experiments in Biomedical Research: A Historical Perspective, *Animals : an Open Access Journal from MDPI*, 3(1), 238-273, doi: 10.3390/ani3010238.

Gaivao, M., F. Dionisio, and E. Gjini (2017), Transmission fitness in co-colonization and the persistence of bacterial pathogens, *Bulletin of mathematical biology*, 79(9), 2068-2087, doi: 10.1007/s11538-017-0320-3.

Garcia-Cazorla, Y., M. Getino, D. J. Sanabria-Rios, N. M. Carballeira, F. de la Cruz, I. Arechaga, and E. Cabezón (2018), Conjugation inhibitors compete with palmitic acid for binding to the conjugative traffic ATPase TrwD, providing a mechanism to inhibit bacterial conjugation, *The Journal of biological chemistry*, 293(43), 16923-16930, doi: 10.1074/jbc.RA118.004716.

Garcia-Quintanilla, M., F. Ramos-Morales, and J. Casades (2008), Conjugal transfer of the *Salmonella enterica* virulence plasmid in the mouse intestine, *Journal of bacteriology*, 190(6), 1922-1927, doi: 10.1128/jb.01626-07.

Getino, M., D. J. Sanabria-Rios, R. Fernandez-Lopez, J. Campos-Gomez, J. M. Sanchez-Lopez, A. Fernandez, N. M. Carballeira, and F. de la Cruz (2015), Synthetic Fatty Acids Prevent Plasmid-Mediated Horizontal Gene Transfer, *MBio*, 6(5), e01032-01015, doi: 10.1128/mBio.01032-15. Getino, M., R. Fernandez-Lopez, C. Palencia-Gandara, J. Campos-Gomez, J. M. Sanchez-Lopez, M. Martinez, A. Fernandez, and F. de la Cruz (2016), Tazawaic acids, a chemically novel set of bacterial conjugation inhibitors, *PloS one*, 11(1), e0148098, doi: 10.1371/journal.pone.0148098.



- Geyer, M. A., P. V. Russo, and V. L. Masten (1986), Multivariate assessment of locomotor behavior: pharmacological and behavioral analyses, *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 25(1), 277-288.
- Gomez-Simmonds, A., and A.-C. Uhlemann (2017), Clinical Implications of Genomic Adaptation and Evolution of Carbapenem-Resistant *Klebsiella pneumoniae*, *The Journal of infectious diseases*, 215(suppl\_1), S18-S27, doi: 10.1093/infdis/jiw378.
- Goncalves, L. F., T. Q. Machado, C. Castro-Pinheiro, N. G. de Souza, K. J. Oliveira, and C. Fernandes-Santos (2017), Ageing is associated with brown adipose tissue remodelling and loss of white fat browning in female C57BL/6 mice, *International journal of experimental pathology*, 98(2), 100-108, doi: 10.1111/iep.12228.
- Gonzalez-Zorn, B., and J. A. Escudero (2012), Ecology of antimicrobial resistance: humans, animals, food and environment, *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 15(3), 101-109, doi: 10.2436/20.1501.01.163.
- Gottig, S., T. M. Gruber, B. Stecher, T. A. Wichelhaus, and V. A. Kempf (2015), In vivo horizontal gene transfer of the carbapenemase OXA-48 during a nosocomial outbreak, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 60(12), 1808-1815, doi: 10.1093/cid/civ191.
- Guo, L., J. An, Y. Ma, L. Ye, Y. Luo, C. Tao, and J. Yang (2016), Nosocomial Outbreak of OXA-48-Producing *Klebsiella pneumoniae* in a Chinese Hospital: Clonal Transmission of ST147 and ST383, *PloS one*, 11(8), e0160754, doi: 10.1371/journal.pone.0160754.
- Hennequin, C., and F. Robin (2016), Correlation between antimicrobial resistance and virulence in *Klebsiella pneumoniae*, *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 35(3), 333-341, doi: 10.1007/s10096-015-2559-7.
- Hillman, E. T., H. Lu, T. Yao, and C. H. Nakatsu (2017), Microbial Ecology along the Gastrointestinal Tract, *Microbes Environ*, 32(4), 300-313, doi: 10.1264/jsme2.ME17017.
- Hoyen, C. K., N. J. Pultz, D. L. Paterson, D. C. Aron, and C. J. Donskey (2003), Effect of parenteral antibiotic administration on establishment of intestinal colonization in mice by *Klebsiella pneumoniae* strains producing extended-spectrum beta-lactamases, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(11), 3610-3612.
- Jacobs, D. M., M. C. Safir, D. Huang, F. Minhaj, A. Parker, and G. G. Rao (2017), Triple combination antibiotic therapy for carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*: a systematic review, *Annals of clinical microbiology and antimicrobials*, 16(1), 76, doi: 10.1186/s12941-017-0249-2.
- Jernberg, C., S. Lofmark, C. Edlund, and J. K. Jansson (2010), Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota, *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 11), 3216-3223, doi: 10.1099/mic.0.040618-0.
- Kim, S., A. Covington, and E. G. Pamer (2017), The intestinal microbiota: Antibiotics, colonization resistance, and enteric pathogens, *Immunol Rev*, 279(1), 90-105, doi: 10.1111/imr.12563.

Kizny Gordon, A. E., A. J. Mathers, E. Y. L. Cheong, T. Gottlieb, S. Kotay, A. S. Walker, T. E. A. Peto, D. W. Crook, and N. Stoesser (2017), The hospital water environment as a reservoir for carbapenem-resistant organisms causing hospital-acquired infections- A systematic review of the literature, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 64(10), 1435-1444, doi: 10.1093/cid/cix132.

Knudsen, J. D., and N. Frimodt-Møller (2001), Animal models in bacteriology, *Contributions to microbiology*, 9, 1-14.

Kola, A., M. Holst, I. F. Chaberny, S. Ziesing, S. Suerbaum, and P. Gastmeier (2007), Surveillance of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing bacteria and routine use of contact isolation: experience from a three-year period, *Journal of Hospital Infection*, 66(1), 46-51, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jhin.2007.01.006>.

Kumar, N., et al. (2019), Adaptation of host transmission cycle during *Clostridium difficile* speciation, *Nature genetics*, doi: 10.1038/s41588-019-0478-8.

Last, J. M. (2007), *A Dictionary of Public Health*.

Lee, C. R., J. H. Lee, K. S. Park, Y. B. Kim, B. C. Jeong, and S. H. Lee (2016), Global dissemination of carbapenemase-producing *klebsiella pneumoniae*: epidemiology, genetic context, treatment options, and detection methods, *Front Microbiol*, 7, 895, doi: 10.3389/fmicb.2016.00895.

Lester, C. H., N. Frimodt-Møller, T. L. Sørensen, D. L. Monnet, and A. M. Hammerum (2006), In vivo transfer of the vanA resistance gene from an *Enterococcus faecium* isolate of animal origin to an *E. faecium* isolate of human origin in the intestines of human volunteers, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50(2), 596-599, doi: 10.1128/AAC.50.2.596-599.2006.

Lewis, B. B., C. G. Buffie, R. A. Carter, I. Leiner, N. C. Toussaint, L. C. Miller, A. Gobourne, L. Ling, and E. G. Pamer (2015), Loss of microbiota-mediated colonization resistance to *Clostridium difficile* infection with oral vancomycin compared with metronidazole, *The Journal of infectious diseases*, 212(10), 1656-1665, doi: 10.1093/infdis/jiv256.

Ley, R. E., F. Backhed, P. Turnbaugh, C. A. Lozupone, R. D. Knight, and J. I. Gordon (2005), Obesity alters gut microbial ecology, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(31), 11070-11075, doi: 10.1073/pnas.0504978102.

Liu, L., X. Chen, G. Skogerbo, P. Zhang, R. Chen, S. He, and D. W. Huang (2012), The human microbiome: a hot spot of microbial horizontal gene transfer, *Genomics*, 100(5), 265-270, doi: 10.1016/j.ygeno.2012.07.012.

Lopez-Camacho, E., et al. (2018), Population structure of OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* ST405 isolates during a hospital outbreak characterised by genomic typing, *Journal of global antimicrobial resistance*, 15, 48-54, doi: 10.1016/j.jgar.2018.06.008.

Lowen, A. C., S. Mubareka, T. M. Tumpey, A. García-Sastre, and P. Palese (2006), The guinea pig as a transmission model for human influenza viruses, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(26), 9988-9992, doi: 10.1073/pnas.0604157103.

Lund, M. (1975), Social Mechanisms and Social Structure in Rats and Mice, *Ecological Bulletins*(19), 255-260.

Maehle, A. H. (1987), Animal experimentation from antiquity to the end of the eighteenth century : attitudes and arguments, *Vivisection in Historical Perspective*.

Mathur, R., H. Oh, D. Zhang, S. G. Park, J. Seo, A. Koblansky, M. S. Hayden, and S. Ghosh (2012), A mouse model of *Salmonella typhi* infection, *Cell*, 151(3), 590-602, doi: 10.1016/j.cell.2012.08.042.

McMullen, E. T. (1995), Anatomy of a physiological discovery: William Harvey and the circulation of the blood, *Journal of the Royal Society of Medicine*, 88(9), 491-498.

Menekse, S., Y. Cag, M. E. Isik, S. Sahin, D. Haciseyitoglu, F. Can, and O. Ergonul (2019), The effect of colistin resistance and other predictors on fatality among patients with bloodstream infections due to *Klebsiella pneumoniae* in an OXA-48 dominant region, *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*, doi: 10.1016/j.ijid.2019.06.008.

Mollers, M., S. P. Lutgens, A. F. Schoffelen, P. M. Schneeberger, and A. W. M. Suijkerbuijk (2017), Cost of nosocomial outbreak caused by NDM-1-containing *Klebsiella pneumoniae* in the netherlands, october 2015-january 2016, *Emerging infectious diseases*, 23(9), 1574-1576, doi: 10.3201/eid2309.161710.

Munk, P., et al. (2018), Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries, *Nature microbiology*, 3(8), 898-908, doi: 10.1038/s41564-018-0192-9.

Nguyen, T. L., S. Vieira-Silva, A. Liston, and J. Raes (2015), How informative is the mouse for human gut microbiota research?, in *Dis Model Mech*, edited, pp. 1-16, (c) 2015. Published by The Company of Biologists Ltd.

Nordmann, P., and L. Poirel (2014), The difficult-to-control spread of carbapenemase producers among *Enterobacteriaceae* worldwide, *Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 20(9), 821-830, doi: 10.1111/1469-0691.12719.

Nordmann, P., G. Cuzon, and T. Naas (2009), The real threat of *Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing bacteria, *The Lancet. Infectious diseases*, 9(4), 228-236, doi: 10.1016/s1473-3099(09)70054-4.

O'Malley, C. D. (1964), *Andreas Vesalius of Brussels, 1514-1564*, University of California Press.  
Olsan, E. E., M. X. Byndloss, F. Faber, F. Rivera-Chavez, R. M. Tsois, and A. J. Baumler (2017), Colonization resistance: The deconvolution of a complex trait, *The Journal of biological chemistry*, 292(21), 8577-8581, doi: 10.1074/jbc.R116.752295.

Pacheco, J. M., M. Tucker, E. Hartwig, E. Bishop, J. Arzt, and L. L. Rodriguez (2012), Direct contact transmission of three different foot-and-mouth disease virus strains in swine demonstrates important strain-specific differences, *Veterinary journal (London, England : 1997)*, 193(2), 456-463, doi: 10.1016/j.tvjl.2012.01.012.

Palacios-Baena, Z. R., et al. (2016), Comprehensive clinical and epidemiological assessment of colonisation and infection due to carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in Spain, *The Journal of infection*, 72(2), 152-160, doi: 10.1016/j.jinf.2015.10.008.

Pano-Pardo, J. R., et al. (2013), Infections caused by OXA-48-producing *Klebsiella pneumoniae* in a tertiary hospital in Spain in the setting of a prolonged, hospital-wide outbreak, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 68(1), 89-96, doi: 10.1093/jac/dks364.

Pano-Pardo, J. R., et al. (2016), Community-Onset Bloodstream and Other Infections, Caused by Carbapenemase-Producing Enterobacteriaceae: Epidemiological, Microbiological, and Clinical Features, *Open forum infectious diseases*, 3(3), ofw136, doi: 10.1093/ofid/ofw136.

Pendleton, J. N., S. P. Gorman, and B. F. Gilmore (2013), Clinical relevance of the ESKAPE pathogens, *Expert review of anti-infective therapy*, 11(3), 297-308, doi: 10.1586/eri.13.12.

Pérez-Blanco, V., L. Redondo-Bravo, G. Ruíz-Carrascoso, J. R. Paño-Pardo, R. Gómez-Gil, A. Robustillo-Rodela, J. García-Rodríguez, J. Mingorance, and R. Herruzo (2018), Epidemiology and control measures of an OXA-48-producing Enterobacteriaceae hospital-wide oligoclonal outbreak, *Epidemiology and Infection*, 146(5), 656-662, doi: 10.1017/S0950268818000249.

Perez, F., M. J. Pultz, A. Endimiani, R. A. Bonomo, and C. J. Donskey (2011), Effect of antibiotic treatment on establishment and elimination of intestinal colonization by KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 55(6), 2585-2589, doi: 10.1128/aac.00891-10.

Pica, N., Y.-Y. Chou, N. M. Bouvier, and P. Palese (2012), Transmission of influenza B viruses in the guinea pig, *J Virol*, 86(8), 4279-4287, doi: 10.1128/JVI.06645-11.

Piperaki, E.-T., G. A. Syrogiannopoulos, L. S. Tzouveleakis, and G. L. Daikos (2017), *Klebsiella pneumoniae*: Virulence, Biofilm and Antimicrobial Resistance, *The Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(10), 1002-1005, doi: 10.1097/inf.0000000000001675.

Potter, N. (2005), Kant on Duties to Animals, *Annual Review of Law and Ethics*, 13, 299-311.

Pouriki, S., G. Vrioni, H. Sambatakou, A. Alexopoulou, L. Vasilieva, I. Mani, A. Tsakris, and S. P. Dourakis (2018), Intestinal colonization with resistant bacteria: a prognostic marker of mortality in decompensated cirrhosis, *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology, 37(1), 127-134, doi: 10.1007/s10096-017-3110-9.

Price, R. (2016), O'Neill report on antimicrobial resistance: funding for antimicrobial specialists should be improved, *Eur J Hosp Pharm*, 23(4), 245-247, doi: 10.1136/ejpharm-2016-001013.

Prospero, E., P. Barbadoro, E. Esposto, E. Manso, E. Martini, S. Savini, F. Scaccia, L. Tantucci, P. Pelaia, and M. M. D'Errico (2010), Extended-spectrum beta-lactamases *Klebsiella pneumoniae*: multimodal infection control program in intensive care units, *Journal of preventive medicine and hygiene*, 51(3), 110-115.

Pultz, M. J., and C. J. Donskey (2007), Effects of imipenem-cilastatin, ertapenem, piperacillin-tazobactam, and ceftriaxone treatments on persistence of intestinal colonization by extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains in mice, *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 51(8), 3044-3045, doi: 10.1128/aac.00194-07.

Pultz, N. J., U. Stiefel, and C. J. Donskey (2005), Effects of daptomycin, linezolid, and vancomycin on establishment of intestinal colonization with vancomycin-resistant enterococci and extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* in mice,

Antimicrobial agents and chemotherapy, 49(8), 3513-3516, doi: 10.1128/AAC.49.8.3513-3516.2005.

Qin, J., et al. (2010), A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing, *Nature*, 464(7285), 59-65, doi: 10.1038/nature08821.

Regan, T., and P. Singer (1976), *Animal rights and human obligations*, Prentice-Hall.

Reynier, J. A. (1959), PRESENT status and future development of germfree life studies. Panel discussion, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 78, 375-400.

Sanches, M. D., L. A. N. Mimura, L. R. C. Oliveira, L. L. W. Ishikawa, H. G. Garces, E. Bagagli, A. Sartori, C. S. Kurokawa, and T. F. C. Fraga-Silva (2018), Differential behavior of non-albicans candida species in the central nervous system of immunocompetent and immunosuppressed mice, *Front Microbiol*, 9, 2968, doi: 10.3389/fmicb.2018.02968.

Smillie, C. S., M. B. Smith, J. Friedman, O. X. Cordero, L. A. David, and E. J. Alm (2011), Ecology drives a global network of gene exchange connecting the human microbiome, *Nature*, 480(7376), 241-244, doi: 10.1038/nature10571.

Soave, O., and C. D. Brand (1991), Coprophagy in animals: a review, *The Cornell veterinarian*, 81(4), 357-364.

Song, H. K., and D. Y. Hwang (2017), Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches, *Lab Anim Res*, 33(2), 119-123, doi: 10.5625/lar.2017.33.2.119.

Souli, M., et al. (2010), An outbreak of infection due to beta-Lactamase *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase 2-producing *K. pneumoniae* in a Greek University Hospital: molecular characterization, epidemiology, and outcomes, *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 50(3), 364-373, doi: 10.1086/649865. Stevenson, R. (2008-08-21), WO2008098297A1.

Thakur, K. K., C. W. Revie, D. Hurnik, Z. Poljak, and J. Sanchez (2015), Simulation of between-farm transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Ontario, Canada using the North American Animal Disease Spread Model, *Preventive Veterinary Medicine*, 118(4), 413-426, doi: <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.01.006>.

The Human Microbiome Project Consortium (2012), Structure, function and diversity of the healthy human microbiome, *Nature*, 486(7402), 207-214, doi: 10.1038/nature11234.

Tischendorf, J., R. A. de Avila, and N. Safdar (2016), Risk of infection following colonization with carbapenem-resistant Enterobacteriaceae: A systematic review, *American journal of infection control*, 44(5), 539-543, doi: 10.1016/j.ajic.2015.12.005.

Turnbaugh, P. J., F. Backhed, L. Fulton, and J. I. Gordon (2008), Diet-induced obesity is linked to marked but reversible alterations in the mouse distal gut microbiome, *Cell host & microbe*, 3(4), 213-223, doi: 10.1016/j.chom.2008.02.015.

Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen (2012), Primer3--new capabilities and interfaces, *Nucleic Acids Res*, 40(15), e115-e115, doi: 10.1093/nar/gks596.

- van 't Veen, A., A. van der Zee, J. Nelson, B. Speelberg, J. A. J. W. Kluytmans, and A. G. M. Buiting (2005), Outbreak of infection with a multiresistant *Klebsiella pneumoniae* strain associated with contaminated roll boards in operating rooms, *Journal of clinical microbiology*, 43(10), 4961-4967, doi: 10.1128/JCM.43.10.4961-4967.2005.
- van Bunnik, B. A., W. E. Katsma, J. A. Wagenaar, W. F. Jacobs-Reitsma, and M. C. de Jong (2012), Acidification of drinking water inhibits indirect transmission, but not direct transmission of *Campylobacter* between broilers, *Prev Vet Med*, 105(4), 315-319, doi: 10.1016/j.prevetmed.2012.03.007.
- van Schaik, W. (2015), The human gut resistome, *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 370(1670), 20140087-20140087, doi: 10.1098/rstb.2014.0087.
- von Staden, H., and H. Chalcidionius (1989), *Herophilus: The Art of Medicine in Early Alexandria: Edition, Translation and Essays*, Cambridge University Press.
- Weil, E. (1957), The Echo of Harvey's *De Motu Cordis* (1628) 1628 to 1657, *Journal of the History of Medicine and Allied Sciences*, XII(4), 167-174, doi: 10.1093/jhmas/XII.4.167.
- Weissbrod, L., F. B. Marshall, F. R. Valla, H. Khalaily, G. Bar-Oz, J.-C. Auffray, J.-D. Vigne, and T. Cucchi (2017), Origins of house mice in ecological niches created by settled hunter-gatherers in the Levant 15,000 y ago, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, doi: 10.1073/pnas.1619137114.
- Werner, G. (2017), Targeting an essential component of gram-positive type IV secretion systems involved in gene transfer kills 2 birds with 1 stone, *The Journal of infectious diseases*, 215(12), 1777-1778, doi: 10.1093/infdis/jix228.
- Williams, S. C. P. (2014), Gnotobiotics, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(5), 1661-1661, doi: 10.1073/pnas.1324049111.
- Wyres, K. L., and K. E. Holt (2018), *Klebsiella pneumoniae* as a key trafficker of drug resistance genes from environmental to clinically important bacteria, *Current opinion in microbiology*, 45, 131-139, doi: 10.1016/j.mib.2018.04.004.
- Zurek, L., and A. Ghosh (2014), Insects represent a link between food animal farms and the urban environment for antibiotic resistance traits, *Applied and environmental microbiology*, 80(12), 3562-3567, doi: 10.1128/aem.00600-14.
- Zwet, W. C. v. d., G. A. Parlevliet, P. H. M. Savelkoul, J. Stoof, A. M. Kaiser, J. G. M. Koeleman, and C. M. J. E. Vandenbroucke-Grauls (1999), Nosocomial outbreak of gentamicin-resistant *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit controlled by a change in antibiotic policy, *Journal of Hospital Infection*, 42(4), 295-302, doi: 10.1053/jhin.1998.0611.



